



DEPARTEMENT DE BIOLOGIE

MÉMOIRE DE FIN D'ÉTUDES

Présenté par

**Mme MEZARJA Karima**

Pour l'obtention du diplôme de

**MASTER EN BIOLOGIE**

**Spécialité: Production & Transformation laitière**

THÈME

**Essai de Fabrication d'un fromage frais à partir  
de souches autochtones**

Soutenue publiquement le 17/09/2018

DEVANT LE JURY

Président	M. BEKADA A.	Professeur	U. Mostaganem
Encadreur	M. NEMICHE S.	Professeur	U. Mostaganem
Co-Encadreur	Mme. MEGHOUFEL N.	Doctorante	U. Mostaganem
Examineurs	M. DAHOU A.	Docteur	U. Mostaganem

*Thème Réalisé au laboratoire de Recherche en Sciences Techniques & Production Animale  
(LSTPA), Mostaganem.*

2017 – 2018

تهدف الدراسة الحالية إلى إنتاج جبن طازج انطلاقاً من مخمرات لبينية تحتوي على سلالات ذاتية، معزولة أو مستخلصة من جبن الماعز من منطقة النعامة، والتي تم اختيارها وتحديدتها باستعمال تقنية MALDITOF / MS. الخمائر اللبنية المستخدمة، تحتوي كل منها على سلالتين من نوع *Lactococcus lactis* و *mesenteroides Leuconostoc*. خضعت التخمر لتقييم قدراتها التكنولوجية الجبن. إن قياس نشاط التخمض يبين أن تخمرنا لديه قوة حمضية بطيئة ولكنها مرضية بالإضافة إلى قوة بروتينية عالية نسبياً وغياب تام لتحلل الدهون. وأعقب إنتاج الجبن لدينا من قبل تذوق أمام لجنة الحكم الساذجة لتحديد تصوره هم *hedonic* من المنتجات. وقد وصفت جميع الجبن وجود طعم لبناني واضح، مع جوانب مختلفة. الجبن على وجه الخصوص يسر المتذوقون، في شكله الطبيعي ولكن أيضاً النكهة وهذا يعني أن التخمر المستخدمة لديها إمكانية جيدة لاستخدامها في المستقبل في وسط صناعة الجبن.

**الكلمات الدالة:** التخمر، التخمير، الألبان الطازجة، بكتيريات حمض اللبن.

## Résumé

La présente étude, vise à fabriquer des fromages frais à partir de ferments contenant des souches autochtones, toutes isolées à partir du Jben de chèvre de la région de Nâama, sélectionnées et identifiées par MALDITOF / MS.

Les ferments lactiques mésophiles, contiennent chacun une souche appartenant au *Lactococcus lactis* et une autre *Leuconostoc mesenteroides*.

Les ferments ont été soumis à une évaluation de leurs aptitudes technologiques fromagères. La mesure de l'activité acidifiante à montrer que nos ferments ont un pouvoir acidifiant lent mais satisfaisant ainsi qu'un pouvoir protéolytique assez élevé et une absence totale de lipolyse.

La fabrication de nos fromages a été suivie par une dégustation devant un jury à panel naïf afin de déterminer leur perception hédonique aux produits.

Tous les fromages ont été décrits ayant un goût lactique apparent, avec différents aspects. Un fromage en particulier a plu aux dégustateurs, sous sa forme nature mais aussi aromatisé et cela implique que le ferment utilisé présente un bon potentiel d'utilisation future dans le milieu de l'industrie fromagère.

**Mots clés :** Ferments mésophiles, aptitudes technologiques, fromages frais, bactéries lactiques.

## Summary

The present study aims to produce fresh cheeses from fermented yeasts containing indigenous strains, all isolated from the goat Jben of the Nâama region, selected and identified by MALDITOF / MS.

The mesophilic lactic ferments, each contain a strain belonging to *Lactococcus lactis* and another *Leuconostoc mesenteroides*.

The ferments were subjected to an evaluation of their cheese technological abilities. The measurement of the acidifying activity to show that our ferments have a slow but satisfactory acidifying power as well as a relatively high proteolytic power and a total absence of lipolysis.

A tasting in front of a naive panel jury to determine their hedonic perception of the products followed the production of our cheeses.

All cheeses have been described having an apparent lactic taste, with different aspects. A cheese in particular pleased the tasters, in its natural form but also flavored and this implies that the ferment used has a good potential for future use in the middle of the cheese industry.

**Key words :** Mesophilic ferments, technological abilities, fresh cheeses, lactic acid bacteria.

# Table des matières

## *Partie bibliographiques*

Introduction	1
--------------	---

### **Chapitre 1 : Les bactéries lactiques**

---

1. Les bactéries lactiques	2
1.1. Généralités	2
1.1.1. Définition et principales caractéristiques	2
1.1.2. Habitat	2
1.1.3. Taxonomie et classification	2
1.2. Caractéristiques des principaux genres de bactéries lactiques	3
1.2.1. Le genre <i>Lactobacillus</i>	3
1.2.2. Le genre <i>Lactococcus</i>	4
1.2.3. Le genre <i>Streptococcus</i>	4
1.2.4. Le genre <i>Enterococcus</i>	4
1.2.5. Le genre <i>Leuconostoc</i>	5
1.2.6. Le genre <i>Pediococcus</i>	5
1.2.7. Le genre <i>Bifidobacterium</i>	6
1.3. Le métabolisme chez les bactéries lactiques	6
1.3.1. Métabolisme glucidique	6
1.3.1.1. Principales voies fermentaires	6
• Voie homofermentaire	6
• Voie hétérofermentaire	7
1.3.2. Métabolisme azoté	8
1.3.3. Métabolisme lipidique	9
1.3.4. Métabolisme du citrate	10
1.4. Applications industrielles des bactéries lactiques	

### **Chapitre 2 : Les ferments lactiques**

---

2. Les ferments lactiques	13
2.1. Généralités sur les ferments lactiques	13
2.1.1. Définition	13
2.1.2. Rôle des ferments	13
2.1.3. Types de ferments lactiques	14
2.1.3.1. Les ferments thermophiles	14
2.1.3.2. Les ferments mésophiles	14
2.2. Aptitudes technologiques des bactéries lactiques	15
2.2.1. Activité acidifiante	15
2.2.2. Activité protéolytique	15
2.2.3. Activité lipolytique	15
2.2.4. Pouvoir aromatisant	15
2.2.5. Pouvoir texturant	16
2.2.6. Pouvoir antimicrobien	16
2.3. Fromage frais	16

2.3.1. Composition du fromage frais	17
2.3.2. Transformation du lait en fromage	17
• Coagulation du lait	17
• Egouttage	18

## *Partie expérimentale*

### **Chapitre 3 : Matériel et Méthodes**

---

3. Matériel et Méthodes	19
3.1. Lieu et objectif du travail	19
3.2. Origine des souches utilisées	19
3.3. Milieux de cultures	19
3.4. Revivification des souches lactiques	20
3.5. Purification des souches	20
3.6. Conservation des souches	20
3.7. Choix des ferments	21
3.8. Etude de quelques aptitudes technologiques des ferments reconstitués	21
3.8.1. Pouvoir acidifiant	21
3.8.2. Pouvoir protéolytique	22
3.8.3. Pouvoir lipolytique	22
3.8.4. Production d'acétoïne	22
3.9. Fabrication du fromage	23
3.9.1. Etude des ferments	23
a. Préparation du levain	23
b. Préparation du lait	22
c. Préparation du fromage	22
3.10. Dégustation et analyse sensorielle	25

### **Chapitre 4 : Résultats et Discussion**

---

4. Résultats et discussion	25
4.1. Identification des bactéries lactiques	25
4.1.1. Observation macroscopique	26
4.1.2. Observation microscopique	27
4.2. Résultats d'études de quelques aptitudes technologiques des ferments reconstitués	27
4.2.1. Pouvoir acidifiant	27
4.2.2. Pouvoir protéolytique	30
4.2.3. Pouvoir lipolytique	33
4.2.4. Production d'acétoïne	33
4.3. Résultats de fabrication du fromage	34
4.4. Résultats de la dégustation et de l'analyse sensorielle	35
• L'examen visuel (surface, couleur, aspect)	35
• Impression générale	37
Conclusion	38
Références bibliographiques	39
Annexe	

# Liste des tableaux

<b>N° du tableau</b>	<b>Titre du tableau</b>	<b>N° de la page</b>
<b>Tableau 1</b>	Principales constituants d'un fromage frais	17
<b>Tableau 2</b>	Identification et origine des souches de bactéries lactiques isolées du Jben de chèvre.	19
<b>Tableau 3</b>	Ferments lactiques reconstitués.	21
<b>Tableau 4</b>	Evolution du pH des ferments lactiques en fonction du temps d'incubation.	28
<b>Tableau 5</b>	Evolution de l'acidité Dornic des ferments lactiques en fonction du temps d'incubation.	29
<b>Tableau 6</b>	Résultats de l'activité protéolytique des ferments lactiques reconstitués après 24 heures d'incubation.	31
<b>Tableau 7</b>	Résultats de l'activité protéolytique des ferments lactiques reconstitués après 48 heures d'incubation.	32
<b>Tableau 8</b>	Appréciation des dégustateurs après examen visuel (surface) du fromage frais.	36
<b>Tableau 9</b>	Impression générale des dégustateurs via les différents fromages frais préparés à base de ferments lactiques reconstitués.	37

# Liste des figures

N° de la figure	Titre de la figure	N° de la page
<b>Figure 1</b>	Schéma illustrant la voie homofermentaire pour la production d'acide lactique (Fugelsanget <i>al.</i> , 2007).	7
<b>Figure 2</b>	Schéma illustrant la voie homofermentaire pour la production d'acide lactique, de CO <sub>2</sub> et de l'éthanol ou de l'acide acétique (Fugelsanget <i>al.</i> , 2007).	8
<b>Figure 3</b>	Représentation schématique du système protéolytique de <i>Lactococcuslactis</i> (Atlan et <i>al.</i> ,2008).	9
<b>Figure 4</b>	Principales étapes du métabolisme du citrate par les bactéries lactiques (Drider and Prevost, 2009).	11
<b>Figure 5</b>	Diagramme de fabricatin de fromage frais .	18
<b>Figure 6</b>	Etape de fabrication de fromage frais	24
<b>Figure 7</b>	Observation macroscopique des deux genres de bactéries lactiques sur milieu M17 gélosé après 24 heures d'incubation (à droite : <i>Leuconostoc</i> , à gauche : <i>Latococcus</i> ).	26
<b>Figure 8</b>	Trouble apparent des cultures lactiques dans le bouillon M17 après 24 heures d'incubation à 30°C.	26
<b>Figure 9</b>	Observation microscopique des deux genres de bactéries lactiques après coloration de Gram (a : <i>Leuconostoc</i> , b : <i>Latococcus</i> ).	27
<b>Figure 10</b>	Représentation schématique de l'évolution du pH des ferments lactiques testés en fonction du temps d'incubation	28
<b>Figure 11</b>	Représentation schématique de l'évolution de l'acidité Dornic des ferments lactiques testés en fonction du temps d'incubation.	29
<b>Figure 12</b>	Activité protéolytique des différents ferments lactiques ensemencés après 24 heures d'incubation à 30°C.	30
<b>Figure 13</b>	Diamètres des zones d'hydrolyse des protéines par les ferments lactiques reconstitués à différents pourcentages de poudre de lait rajouté après 24 heures d'incubation.	31
<b>Figure 14</b>	Diamètres des zones d'hydrolyse des protéines par les ferments lactiques reconstitués à différents pourcentages de poudre de lait rajouté après 48 heures d'incubation.	32
<b>Figure 15</b>	Résultats du test de lipolyse des 5 ferments lactiques reconstitués après 24 heures d'incubation à 30°C.	33
<b>Figure 16</b>	Résultats du test de production d'acétoïne.	33
<b>Figure 17</b>	Quatre aspects de 4 fromages frais obtenus après caillage et égouttage.	34
<b>Figure 18</b>	Représentation schématique de l'appréciation visuelle (surface) des fromages frais par nos dégustateurs.	36

<b>Figure 19</b>	Représentation schématisée de l'impression générale des dégustateurs via les différents fromages frais préparés à base de ferments lactiques reconstitués.	37
------------------	--	----

## Liste des abréviations

**ADN** : Acide désoxyribonucléique  
**ATP** : Adénosine triphosphate  
**aw** : Activité de l'eau  
**°C** : Degré Celsius,  
**CO<sub>2</sub>** : Dioxyde de carbone  
**°D** : degré Dornic  
**DLC** : Date Limite de Consommation  
**F** : Ferment  
**FAO** : Food Agriculture Organisation  
**g** : gramme  
**G + C** : Guanine + Cytosine  
**h** : heure  
*Lb.* : *Lactobacillus*  
*Lc.* : *Lactococcus*  
*Ln.* : *Leuconostoc*  
**LSTPA** : Laboratoire de Recherche en Sciences Techniques et Production Animale  
**µl** : microlitre, **µm** : micromètre  
**ml** : millilitre  
**NAD** : Nicotine Adénine Dinucléotide  
**NaCl** : Chlorure de Sodium  
**NaOH** : Hydroxyde de Sodium  
**OMS** : Organisation Mondiale de la Santé  
**PCA** : Plate Count Agar  
**pH** : Potentiel d'hydrogène  
**%** : pour Cent  
*S* : *Streptococcus*  
**Subsp.** : Sous espèce  
**T** : Température  
**UHT** : Ultra Haute Température  
**V** : Volume  
**VP** : Voges-Proskauer

# *Introduction*



# Introduction

---

Les bactéries lactiques interviennent essentiellement dans deux étapes de fabrication des fromages, la coagulation et l'affinage, un lait pasteurisé perd une grande partie de sa flore microbienne, qu'elle soit utile ou pas. Pour permettre la fermentation et la production d'arômes, le lait pasteurisé doit donc être réensemencé par des levains, fournis sous forme liquide ou lyophilisée (Ray, 2003). Les bactéries lactiques qui sont acidifiantes ont une grande importance dans l'économie et présentent une grande utilité du point de vue technologique ; les lactocoques font partie des bactéries lactiques les plus utilisées comme ferments pour de nombreuses fabrications fromagères (Renault, 1996). Selon la technologie mise en œuvre, pour cette production, on distingue plusieurs variétés de fromages dont les fromages frais, ceux à pâte molle et les fromages fondus.

Le fromage fut à son origine, un mode de conservation du lait ou du moins des éléments susceptibles d'être conservés, au prix de fermentations que l'homme a appris à diriger (Eck and Gillis, 2006). Le fromage constitue un élément important dans l'alimentation humaine. Ses taux élevés en lactose, lipides et en protéines en font de lui un aliment nourrissant, riche en énergie (Walther et *al.*, 2008).

Notre manuscrit est structuré en 3 parties, la première est consacrée à une synthèse bibliographique articulée autour de deux chapitres, les bactéries lactiques ainsi que les ferments et le fromage frais.

La seconde partie de notre manuscrit présente le matériel et les méthodes mis en œuvre dans le cadre de la réalisation de ce travail, dont la plus importante partie est la constitution des ferments composés de deux souches, l'une *Leuconostoc* et l'autre *Lactococcus* et l'étude de leurs aptitudes technologiques, l'essai de fabrication des fromages frais et leur dégustation.

Les résultats obtenus et leurs discussions au cours de cette étude sont ensuite exposés dans la troisième partie, ainsi que d'une conclusion générale.

Le but de ce travail était d'élaborer des ferments composés de souches de bactéries lactiques autochtones et de tester leur capacité à fabriquer du fromage frais.

Cette étude, fait partie des travaux d'une thèse de doctorat autour des bactéries lactiques indigènes issue du Jben de chèvre de la région de Nâama, entreprise au Laboratoire de Recherche des Sciences et Techniques de Production Animale.

*Chapitre I*

---

# Les bactéries lactiques

## **1. Les bactéries lactiques**

### **1.1. Généralités**

#### **1.1.1. Définition et principales caractéristiques**

Les bactéries lactiques sont des microorganismes ubiquitaires susceptibles d'être retrouvés dans tous types d'habitat. Elles accompagnent l'activité humaine au quotidien, en tant que bactéries de la flore commensale, de la flore intestinale ou de la flore alimentaire. Une caractéristique commune permet cependant de les utiliser en un seul et vaste groupe : Leur capacité à fermenter les hydrates de carbone en acide lactique (Dellagio *et al.*, 1994). Elles partagent en outre un certain nombre de caractéristiques communes qui forment la base de leur classification. Ce sont des bactéries à Gram positif, asporulées, anaérobies, catalase négative et oxydase négative, se présentant sous différentes formes (cocci, en bâtonnet ou ovoïdes).

#### **1.1.2. Habitat**

Les bactéries lactiques ont pour habitat de nombreux milieux naturels, des végétaux (plantes et fruits), des animaux et des humains (cavités buccales et vaginales, fèces et dans le lait). Mais certaines espèces semblent s'adapter à un environnement spécifique et ne sont guère trouvées ailleurs que dans leurs habitats naturels (Deroissart, 1986).

#### **1.1.3. Taxonomie et classification**

La taxonomie des bactéries lactiques est en évolution permanente, elle prend aujourd'hui en considération tous les éléments phénotypiques et génotypiques de classification, permettant de différencier les espèces et de caractériser des variantes au sein d'une même espèce (Alexandre *et al.*, 2008).

Les différents tests phénotypiques comportent :

- Le type de gram, la morphologie et la disposition cellulaire ;
- Les différents métabolismes glucidiques, protéiques, lipidiques et le caractère fermentaire ;
- La croissance des cellules sur des milieux hostiles ;
- La synthèse d'enzymes (de protéases), de métabolites (exopolysaccharides), de bactériocines, et la résistance aux bactériophages.

Puis, des études basées sur les critères moléculaires ont permis de classer les espèces selon les critères suivants :

- La détermination de la composition des peptidoglycanes (PTG) permettant d'observer le type d'espèce selon la nature de la liaison peptidique.

- Et la composition de l'ADN mesurée par hybridation permettant de différencier les genres et les espèces entre eux. Le pourcentage en bases Guanine + Cytosine (G-C %) permet le rapprochement ou l'espacement des genres (Schleifer *et al.*, 1985; Schleifer, 1986; Farrow *et al.*, 1989).

## **1.2. Caractéristiques des principaux genres de bactéries lactiques**

Le groupe des bactéries lactiques renferme les genres suivants: *Carnobacterium*, *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Oenococcus*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Tetragenococcus*, *Vagococcus* et *Weissella*. Le genre *Bifidobacterium* est considéré comme appartenant aux bactéries lactiques du fait de son effet probiotique sur l'organisme et son utilisation dans les aliments (Vandamme *et al.*, 1996 ; Gevers 2002 ; Patrignani *et al.*, 2006).

### **1.2.1. Le genre *Lactobacillus***

Les bactéries du genre *Lactobacillus* ont des aspects variés allant du bacille long et fin au coccobacille en passant par la forme bâtonnet court ou légèrement flexueux. Ils sont Gram positif, non sporulés, fréquemment associés en chaînettes et habituellement immobiles. Les lactobacilles se montrent généralement plus résistants au stress acide que les lactocoques (Siegumfeldt *et al.*, 2000).

D'après la classification de Kandler and Weiss (1986) et selon leur profil fermentaire, les lactobacilles se répartissent en trois groupes :

Le Groupe I, comprend les espèces homofermentaires obligatoires, c'est-à-dire produisant exclusivement de l'acide lactique à partir du glucose. Ce groupe est constitué d'environ 25 espèces, la plupart thermophiles (*croissance* à 45°C) dont *Lb. delbrueckii*, *Lb. acidophilus* et *Lb. helveticus*. La majorité des espèces sont présentes dans le lait et les produits laitiers.

Le Groupe II, comprend des espèces hétérofermentaires facultatives, c'est-à-dire capables d'utiliser la voie hétérofermentaire dans certaines conditions comme une concentration en glucose limitante. Il est constitué d'une vingtaine d'espèces dont *Lb. casei*, *Lb. curvatus*, *Lb. sake* et *Lb. plantarum*, majoritairement mésophiles (Laurent *et al.*, 1998).

Le Groupe III, est constitué des espèces hétérofermentaires obligatoires, c'est-à-dire utilisant la voie des pentoses phosphates pour la fermentation des hexoses et des pentoses. C'est un groupe qui rassemble des espèces relativement hétérogènes, surtout mésophiles, comme *Lb. brevis*, *Lb. kefir* et *Lb. sanfransisco*. Outre leur présence dans les produits laitiers et carnés, certaines espèces se développent dans le tube digestif de l'homme, et participent à l'équilibre de la flore intestinale (Laurent *et al.*, 1998).

### 1.2.2. Le genre *Lactococcus*

Les lactocoques se retrouvent principalement dans le lait et crèmes fermentés ainsi que dans les fromages où ils sont majoritaires. Ils assurent la conservation et la salubrité des produits. (Millette, 2007).

Appartenant à la famille des *Streptococaceae* et à l'ordre des *Lactobacillales*, elles se présentent sous forme de coques et forment des chaînes de longueurs variables. Ce sont des bactéries homofermentaires, aérobies facultatives, thermosensibles et ne peuvent croître en présence de 6,5% de NaCl ou lorsque le pH est supérieur à 9,6 (Dellagio et al., 1994). Leur température de croissance optimale environne les 30°C.

Les trois espèces représentatives du genre sont : *Lc. lactis*, *Lc. raffinolactis* et *Lc. plantarum* (Prescott et al., 2003)

Les lactocoques ont une faible aptitude biosynthétique comme toutes les bactéries lactiques, ce qui explique leurs exigences du point de vue nutritionnel. Ils utilisent pour leur croissance des éléments carbonés, azotés et phosphatés complexes, ainsi que des facteurs de croissance comme les vitamines et les oligo-éléments (Konnings et al., 1994).

Du point de vue technologique, les lactocoques ont une grande importance dans l'industrie agroalimentaire et en particulier dans l'industrie de transformation laitière. Ils sont classés, selon Novel, (1993) en souche acidifiantes : *Lc. lactis subsp lactis* et *cremoris* et en souches aromatisantes : *Lc. lactis subsp lactis biovar diacetylactis*. Ces souches sont utilisées, comme ferments mésophiles, en particulier pour la fabrication de différents fromages comme les fromages frais.

### 1.2.3. Le genre *Streptococcus*

Comprend essentiellement des espèces d'origine humaine ou animale, dont certaines sont pathogènes comme *S. pyogenes* et *S. agalactiae* et d'autres non pathogènes comme *Streptococcus thermophilus*, considérée comme la seule espèce appartenant aux streptocoques lactiques d'intérêt technologique (Laurent et al., 1998).

De formes sphériques ou ovoïdes, le diamètre des cellules de ce genre sont inférieur à 2µm, disposées en paires ou en chaînes longues (Boullouf, 2016). Microaérophiles et homofermentaires, la teneur molaire en (G + C) de leur ADN varie de 33 % à 46% (Lahtinen et al., 2012).

### 1.2.4. Le genre *Enterococcus*

Le genre *Enterococcus* regroupe plus de 14 espèces, ce sont des cocci à Gram positif, ovoïdes se présentant en paires ou en courtes chaînettes. La composition de leur paroi, leurs caractères

morphologiques, enzymatiques, antigéniques, et leurs aptitudes à se développer dans des milieux hostiles, permettent de les distinguer des autres cocci à Gram positif. Les entérocoques représentent une proportion importante des bactéries autochtones associées à l'appareil gastro-intestinal des mammifères et peuvent causer une infection de cette source endogène. Elles se trouvent essentiellement dans l'intestin et passent dans l'environnement. Leur présence dans les eaux est le marqueur d'une pollution fécale. L'incidence des infections causées par les entérocoques, ainsi que la difficulté croissante de traiter ces infections en raison de la multi-résistance aux antibiotiques, mettent en évidence ces organismes, notamment *Enterococcus faecium* et *Enterococcus faecalis*, parmi les agents pathogènes émergents de l'homme (Morrison et al., 1997; Robredo et al., 2000).

Toutefois, les entérocoques sont omniprésents et se trouvent vivants librement dans le sol, sur les plantes et en grand nombre dans les produits laitiers où dans certains cas, elles prédominent à l'égard des lactobacilles et des lactocoques (Franz et al., 1999 ; Giraffa, 2002). La présence d'entérocoques dans les produits laitiers a longtemps été considérée comme un indicateur de mauvaises conditions sanitaires lors de la production et la transformation du lait.

En revanche, de nombreux auteurs suggèrent que les entérocoques peuvent avoir un rôle potentiellement souhaitable dans certains fromages, en raison de leurs activités protéolytiques et lipolytiques, dans le développement des saveurs typiques et pour la production d'enterocines avec une activité anti-*Listeria* (Giraffa et al., 1997; Ennahar and Deschamps, 2000).

#### **1.2.5. Le genre *Leuconostoc***

La famille des *leuconostocaceae*, contient des coques ovoïdes, pouvant être allongés ou elliptiques. Ce sont des cellules sphériques qui se disposent en paires ou en chaînes et sont caractérisées par un métabolisme hétérofermentaire en convertissant le glucose en D-lactate et éthanol ou en acide acétique par la voie de transcétolase. Elles sont incapables de dégrader l'arginine ce qui les distingue des lactobacilles hétérofermentaires (Gonzalez et al., 2007). On range habituellement les leuconostocs dans les anaérobies facultatifs, mais certains les considèrent comme des anaérobies aérotolérants. Ils sont exigeants et présentent souvent une auxotrophie pour les acides aminés, les peptides, les vitamines, les sels minéraux et les glucides (Dellaglio et al., 1994).

Ce genre comprend les espèces suivantes : *Ln. mesenteroides* avec ces sous-espèces *mesenteroides*, *cremoris*, *dextranicum*, *Ln. Lactis*, *Ln. Pseudomesenteroides* et *Ln. paramesenteroides* (Collins et al., 1993 ; Laease, 2005).

### 1.2.6. Le genre *Pediococcus*

Il rassemble des coques homofermentaires dont la particularité qui les différencie des autres genres est le regroupement en tétrades. Le genre *Pediococcus* est mésophile. Leur exigence nutritionnelle, leur faible activité protéolytique et le plus souvent leur incapacité à utiliser le lactose, ne leur permettent pas d'acidifier et de coaguler le lait. Leur fermentation homolactique donne parfois de l'acide lactique racémique.

### 1.2.7. Le genre *Bifidobacterium*

Les *Bifidobacterium* se caractérisent par leur forme très irrégulière, souvent en V ou en Y, et pouvant être des fois sous forme de coccoïde. Elles se différencient des autres bactéries lactiques par leur caractère anaérobie, leur G + C % élevé, et la présence d'une enzyme, la fructose-6-phosphate phosphocétolase. Celle-ci leur permet de fermenter les hexoses en produisant de l'acide acétique et de l'acide lactique (rapport 3:2), ainsi qu'en moindre proportion de l'éthanol et d'autres acides organiques. Cette fermentation « lactique » a conduit à les rapprocher du groupe des bactéries lactiques. Leur température optimale de croissance est comprise entre 37°C et 41°C. Elles se développent à pH supérieur à 5. Elles sont isolées de l'homme et des animaux (Laurent, 1998).

## 1.3. Le métabolisme chez les bactéries lactiques

### 1.3.1. Métabolisme glucidique

La caractéristique essentielle du métabolisme des bactéries lactiques est la fermentation des glucides couplée à la phosphorylation au niveau du substrat. Les bactéries lactiques en tant que groupe présentent une capacité énorme à dégrader différents glucides et composés apparentés. Généralement, le produit final prédominant est bien sûr l'acide lactique.

Il est toutefois clair que les bactéries lactiques s'adaptent à diverses conditions et modifient leur métabolisme en conséquence. Cela peut conduire à des modèles de produits finis significativement différents (Salminen *et al.*, 1998)

#### 1.3.1.1. Principales voies fermentaires

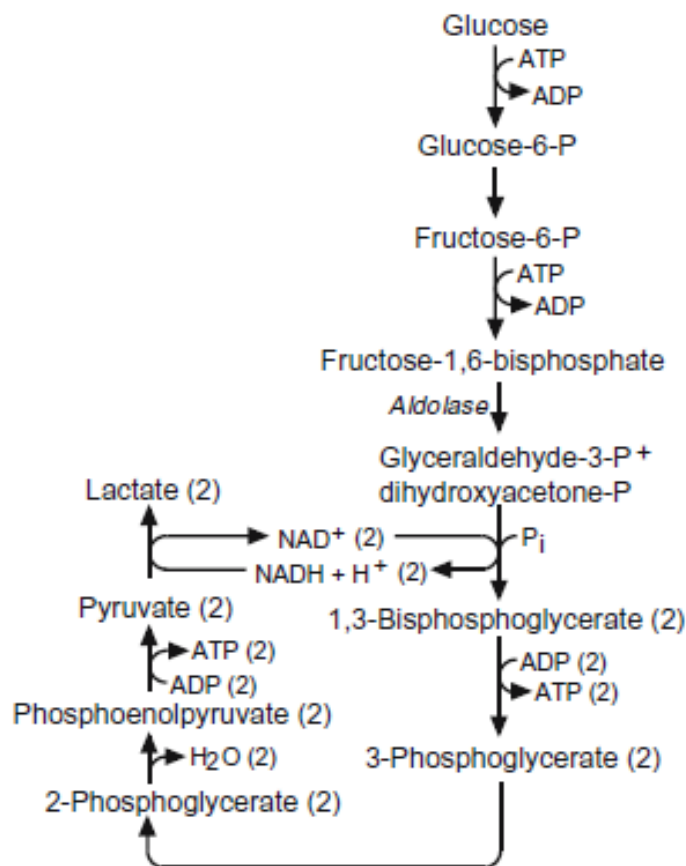
Les bactéries lactiques utilisent principalement l'une des deux voies majeures du métabolisme des sucres, la voie homofermentaire ou celle d'Embden Meyerhof Parnas (EMP) et la voie hétérofermentaire ou celle des pentoses phosphates (Boumediene, 2013). La figure 1 et 2, représentent les deux voies de fermentations lactiques (homo et hétérofermentaire).

- **Voie homofermentaire**

Cette voie métabolique conduit dans des conditions optimales de croissance à la production de deux molécules de lactate et deux molécules d'ATP par molécule de glucose consommée. Donc

l'acide lactique est le produit essentiel de ce type de fermentation. L'enzyme clé indispensable à son fonctionnement est le fructose-1,6-biphosphate-alodolase (FBA).

La fermentation homolactique est effectuée par tous les membres des genres bactériens *Streptococcus*, *Pediococcus* et *Microbacterium*, par beaucoup de *Lactobacillus*, par certains *Bacillus* et certaines moisissures (Toumi, 2009).

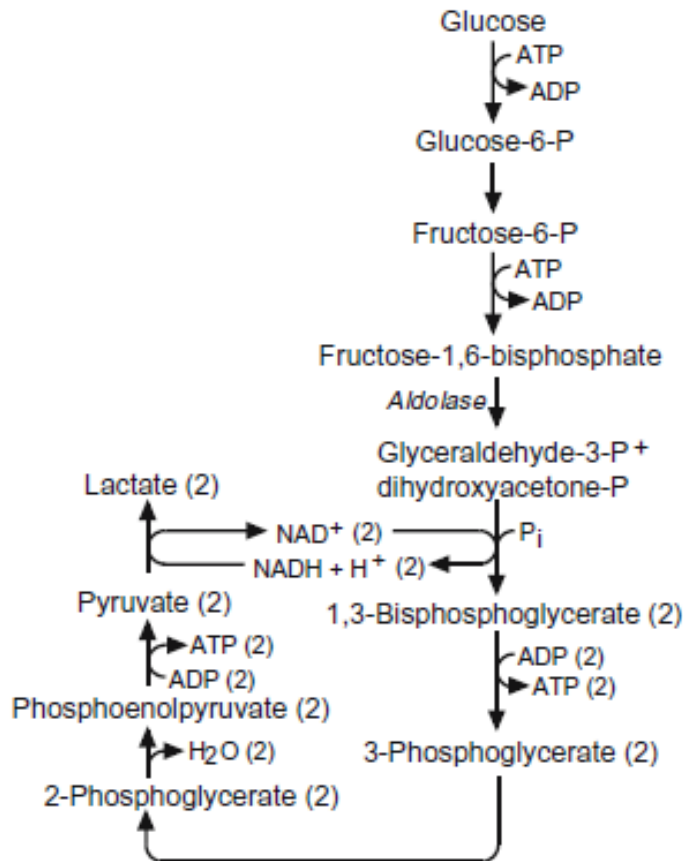


**Figure 1.** Schéma illustrant la voie homofermentaire pour la production d'acide lactique (Fugelsanget *al.*, 2007).

- **Voie hétérofermentaire**

Dans cette voie, en plus de l'acide lactique formé, il y'a aussi production d'acétate, d'éthanol et de CO<sub>2</sub>. Les principaux groupes de bactéries lactiques présentant ce type de métabolisme sont les *Leuconostoc* et certains *Lactobacilles* (Hadef, 2012).

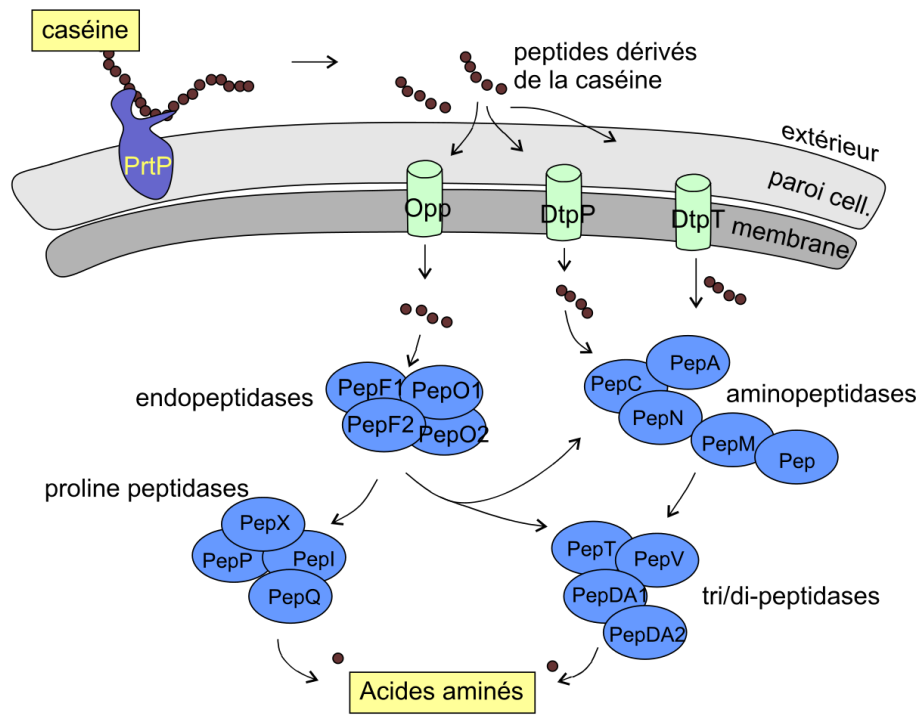




**Figure 2.** Schéma illustrant la voie homofermentaire pour la production d'acide lactique, de CO<sub>2</sub> et de l'éthanol ou de l'acide acétique (Fugelsanget *al.*, 2007).

### 1.3.2. Métabolisme azoté

Du fait de leurs nombreuses auxotrophies pour les acides aminés, les bactéries lactiques exigent la fourniture exogène de ces derniers pour leur croissance, car elles sont en général, incapables d'en effectuer la synthèse à partir d'une source azotée minérale simple. La croissance des bactéries lactiques repose sur un système protéolytique comportant des protéases intracellulaires, de systèmes de transport pour les peptides et une multitude de peptidases intracellulaires (Hadeff, 2012). La figure 3, illustre bien le fonctionnement du système protéolytique chez le genre lactique *Lactococcus lactis*.



**Figure 3.** Représentation schématique du système protéolytique de *Lactococcus lactis* (Atlan et al., 2008).

### 1.3.3. Métabolisme lipidique

La capacité des bactéries lactiques à décomposer les lipides ou à déshydrater les acides gras diffère largement entre les espèces. Cependant, elles ne sont pas très lipolytiques comparativement à d'autres espèces bactériennes comme les *Pseudomonas* (Kalagridou, 1984). Néanmoins, des activités d'hydrolyse d'esters ont été mesurées chez ce groupe de bactéries. L'estérase de *Lactococcus actis* est capable d'hydrolyser la matière grasse du lait une fois que celle-ci a été pré hydrolysée par d'autres lipases ou estérases (Holland et al., 2004).

Trois points communs se dégagent pour les estérases des bactéries lactiques (Atlan et al., 2008) :

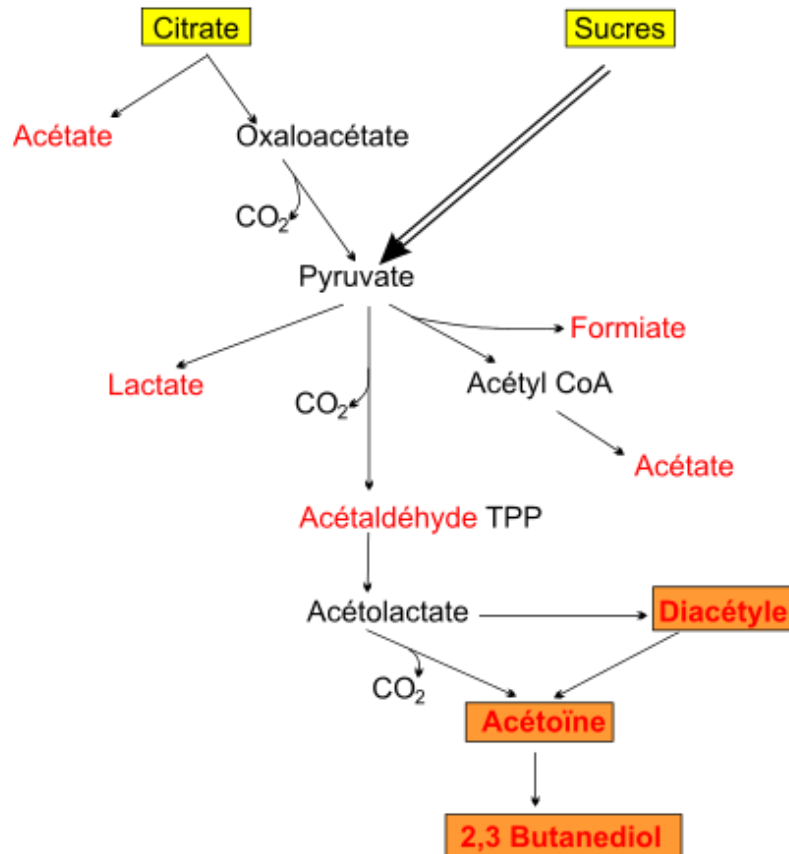
- Elles hydrolysent préférentiellement des esters comportant des chaînes d'acides gras en C4 et C6.
- Elles sont inhibées par des inhibiteurs d'enzymes à sérine ce qui permet de les classer dans la famille des hydrolases possédant une sérine dans leur site actif.
- Elles sont très majoritairement décrites comme étant des enzymes localisées à l'intérieur de la bactérie.

Les estérases sont des enzymes clés dans le développement de la saveur du produit fermenté (Atlan et al., 2008).

### 1.3.4. Métabolisme du citrate

Dans les produits laitiers fermentés, l'acide citrique est considéré comme étant le principal précurseur de la formation des composés aromatiques tels que l'acétate, l'acétoïne et le diacétyl.

Le citrate est transporté à l'intérieur de la cellule grâce à une citrate perméase, puis scindé en acétate et oxaloacétate grâce à une citrate lyase. L'oxaloacétate est décarboxylé par la suite en pyruvate. Le flux du pyruvate provenant du métabolisme est principalement transformé en lactate via la lactate déshydrogénase afin de réoxyder le NADH<sub>2</sub> produit lors du catabolisme du glucose comme cela est montré dans la figure 4 (Kassas, 2017).



**Figure 4.** Principales étapes du métabolisme du citrate par les bactéries lactiques (Dridier and Prevost, 2009).

#### 1.4. Applications industrielles des bactéries lactiques

Les bactéries lactiques sont utilisées dans plusieurs secteurs d'activités, notamment dans le domaine de l'agriculture, de la santé et de l'industrie agroalimentaire.

Les bactéries lactiques sont utilisées dans le domaine de l'agriculture comme agents biologiques de conservation du fourrage par fermentation acidifiante. L'utilisation des bactéries lactiques dans les ensilages, permet de limiter ou d'inhiber certaines voies métaboliques indésirables telles que l'acétogénèse et la protéolyse, conduisant à l'amélioration de la

qualité nutritive du fourrage. Ainsi, on a pu observer chez le bétail une augmentation de 5 à 11 % des performances zootechniques telles que la digestibilité, le gain de poids ou la production laitière (Khuntia and Chaudhary, 2002; Salawu *et al.*, 2001). L'étiologie des effets bénéfiques engendrés par les souches lactiques dans les ensilages reste encore très peu élucidée mais des études suggèrent un effet probiotique affectant favorablement l'écosystème et le pH ruminal (Gollop *et al.*, 2005; Weinberg *et al.*, 2004).

Dans le domaine de la santé, certaines bactéries lactiques spécifiques sont utilisées comme probiotiques c'est-à-dire des micro-organismes vivants dont l'application à l'homme ou à l'animal exerce un effet bénéfique sur ce dernier par amélioration des propriétés de la flore intestinale. Les espèces couramment utilisées sont *Lb. Acidophilus*, *Lb. casei*, *Lb. johnsonii*, *Lb. reuteri*, *Lb. delbrueckii, subsp bulgaricus* (Salminen *et al.*, 2004). Les souches lactiques sont également utilisées dans le traitement de certaines affections telles que les diarrhées, les allergies alimentaires, l'intolérance au lactose et l'hypercholestérolémie (Mombelli *et al.*, 2000 ; Mombelli and Gismondo, 2000).

Enfin en industrie agroalimentaire, les bactéries lactiques sont employées pour aider à la fois à la fabrication et à la conservation des produits à partir de certaines matières premières telles que le lait, la viande, le poisson, les végétaux et les céréales.

*Chapitre I.I*

---

## Les ferments lactiques

## **2. Les ferments lactiques**

### **2.1. Généralités sur les ferments lactiques**

Les ferments lactiques sont ajoutés au lait pour démarrer le procédé de fermentation. Ils sont employés pour la production d'une grande gamme de produits laitiers comme le fromage, le yaourt, le lait fermenté, le beurre et la crème (Chen, 2010 ; HylckamaVliega et Hugenholtzb Van, 2007 ; Pfeiler et Klaenhammer, 2007 ; Wildman, 2007 ; Salminen *et al.*, 2004).

Puisque la flore lactique originale du lait soit inefficace, incontrôlable, imprévisible, ou bien détruite sous l'effet de traitement thermique auquel le lait est soumis, les ferments lactiques ajoutés au lait, suite à l'étape de pasteurisation, assurent une fermentation plus contrôlée et plus prévisible (Yildiz, 2010 ; Chamba, 2008 ; Makarova *et al.*, 2006 ; Badis *et al.*, 2005 ; Parente et Cogan, 2004).

#### **2.1.1. Définition**

Un ferment lactique est une préparation comprenant un grand nombre de microorganismes (une seule espèce ou plusieurs), qui est ajoutée au lait pour produire un aliment fermenté en accélérant et en orientant son processus de fermentation (Yildiz, 2010 ; Leroy et De Vuyst, 2004). La production des ferments lactiques est fondée sur la technique de la « culture pure » initialement élaborée par Robert Koch. Dans une culture pure, chaque colonie microbienne se compose de cellules qui proviennent toutes de la même cellule. Ceci assure que les cultures ne sont pas un mélange de différents microorganismes inconnus et elles peuvent donc être dénombrées et exploitées pour produire les réactions biochimiques prédéterminées (Solieri et Giudici, 2009 ; Chamba, 2008 ; Makarova *et al.*, 2006 ; Parente et Cogan, 2004).

#### **2.1.2. Rôle des ferments**

La pasteurisation du lait réduit fortement la microflore indigène. Le rôle principal des ferments est par conséquent d'initier et conduire le procédé de fermentation selon les propriétés souhaitées dans le produit fini (Carminati *et al.*, 2010 ; Mozzi *et al.*, 2010 ; Saithong *et al.*, 2010 ; HylckamaVliega et Hugenholtzb van, 2007). Les ferments contribuent également aux caractéristiques organoleptiques, nutritionnelles et sensorielles des produits et à leur sûreté (Yildiz, 2010). L'impact sur la qualité du produit est fortement dépendant de la souche utilisée et varie entre les souches selon leurs activités et voies métaboliques (Hylckama and Hugenholtzb, 2007). Les ferments sont utilisés en raison de leur capacité de production d'acide lactique à partir du lactose. De plus, ils possèdent d'autres fonctions importantes comme l'inhibition des microorganismes indésirables, l'amélioration des propriétés sensorielles et rhéologiques, en plus de leurs bienfaits prouvés pour la santé.

### 2.1.3. Types de ferments lactiques

Les ferments lactiques peuvent être classés en se basant sur leur fonction, leur température de croissance, ou leurs compositions (Carminati et *al.*, 2008).

- **Selon la composition** : selon la fédération internationale de laiterie (1997), les ferments lactiques peuvent être classés en 3 catégories (Wouters et *al.*, 2002 ; Mounet et *al.*, 2008).
  - Les ferments purs : constitués d'une souche d'une seule espèce bien caractérisée, c'est-à-dire, une culture provenant en principe d'une seule cellule bactérienne.
  - Les ferments mixtes : ils sont formés d'un mélange de souches en nombres et en proportions indéfinis. Ces souches appartiennent aux différents types lysotypiques et ont donc, en général, une bonne activité acidifiante.
  - Les ferments mixtes sélectionnés : contiennent plusieurs souches bien définies selon le cahier des charges de l'utilisateur.
- **Selon le type de croissance** : les ferments lactiques sont, selon les productions industrielles réaliser, des ferments mésophiles et des ferments thermophiles.

#### 2.1.3.1. Les ferments thermophiles

Ils comprennent les Lactobacilles, les *Bifidobacterium* et les espèces *Streptococcus thermophilus*. Leur température optimale de croissance se situe entre 4°C et 50°C. les ferments thermophiles sont souvent utilisés pour la fabrication des yaourts, certains laits fermentés et quelques fromages à pâte cuite tel que l'Emmental et la Gruyère (Mayra-Makinen and Bigret, 2004 ; Carminati et *al.*, 2010).

#### 2.1.3.2. Les ferments mésophiles

Les bactéries lactiques qui constituent ces ferments ont une température optimale de croissance qui varie selon les souches entre 25°C et 30°C et peuvent atteindre une température maximale de fermentation de 38°C à 40°C. Ils sont constitués essentiellement des espèces acidifiantes (*Lactococcus lactis* sp. *lactis*, *Lactococcus lactis* sp. *cremoris*) et des espèces aromatisantes (*Lactococcus lactis* sp. *lactis* biovar. *Diacetylactis*, *Leuconostoc mesenteroides* sp. *cremoris*). Les ferments mésophiles sont habituellement utilisés dans la fabrication de plusieurs variétés de fromages, en particulier les fromages frais, de certains laits fermentés et du beurre. (Chamba, 2008 ; Carminati et *al.*, 2010).

## **2.2. Aptitudes technologiques des bactéries lactiques**

### **2.2.1. Activité acidifiante**

L'acidification est le rôle principal des bactéries utilisées comme ferments. Celle-ci à différents ponts :

- La coagulation du lait (en facilitant l'action de l'enzyme de la présure) et l'augmentation de la synérèse du caillé.
- La participation aux propriétés rhéologiques du produit final.
- L'inhibition de la croissance des bactéries nuisibles (Larsen, 1990)

### **2.2.2. Activité protéolytique**

Les bactéries lactiques possèdent des protéinases, des peptidases nécessaires à la dégradation des protéines du lait en peptides et acides aminés. Ceux-ci peuvent alors être transformés en alcools et en acides. Cette activité protéolytique intervient de ce fait sur le rendement fromager, la texture et la saveur typique du fromage et par conséquent sur les caractéristiques du produit final (Chahbal et *al.*, 1993).

Dans le fromage, l'activité des enzymes protéolytiques des bactéries lactiques est fondamentale car elle va participer à la formation du goût ou des arômes : la protéolyse due aux bactéries lactiques va surtout conduire à des peptides courts et des acides aminés libres. Ces derniers, sont des précurseurs pour de nombreux produits d'arômes. En effet, la méthionine peut conduire à des composés soufrés caractéristiques. Ceci, après leur dégradation par la flore d'affinage (Schirch et *al.*, 1985 ; Ott et *al.*, 1997).

### **2.2.3. Activité lipolytique**

L'activité lipolytique des bactéries lactiques est moins importante que leurs activités protéolytiques. Il paraît, au travers des publications scientifiques, que les connaissances sur l'activité lipolytique des bactéries lactiques soient encore fragmentaires. Néanmoins, les voies métaboliques liées à la lipolyse génèrent des acides gras libres et des précurseurs d'arômes qui entrent dans la saveur globale des produits alimentaires (Bigret, 1994).

### **2.2.4. Pouvoir aromatisant**

Les bactéries lactiques sont capables de produire de nombreux composés aromatiques (tels que : l' $\alpha$ -acétolactate, l'acétaldéhyde, le diacétyl, l'acétoine et 2,3 butanediol, l'éthanol, l'acétate, le formiate,...etc) principalement à partir du lactose, du citrate, des acides aminés et des matières grasses. Cette fonctionnalité est particulièrement importante lors de l'élaboration des laits



fermentés, des fromages frais, crème et beurre, dont l'arôme principal est liée à cette activité microbienne (Bourgeois and Larpent, 1996 ; Gerrit et *al.*, 2005 ; Cholet, 2006).

### **2.2.5. Pouvoir texturant**

La capacité des bactéries lactiques a synthétisé des exopolysaccharides (EPS) joue un rôle important pour la consistance et la rhéologie des produits transformés.

L'utilisation des EPS par les souches *Lactococcus lactis ssp cremoris* est très prometteuse pour la structure de la viscosité des produits laitiers fermentés (Leroy and De Vrysa, 2004 ; Ho et *al.*, 2007).

### **2.2.6. Pouvoir antimicrobien**

Les bactéries lactiques produisent une variété de composés antimicrobiens qui sont utilisés dans la fermentation et la bioconservation des aliments (Labioui et *al.*, 2005). tels que les acides organiques, le peroxyde d'hydrogène, le dioxyde d'hydrogène, le dioxyde de carbone et les bactériocines (Dortu and Thonart, 2009).

## **2.3. Fromage frais**

Selon la norme du *Codex alimentarius* (norme CODEX STAN 221 – 2001 pour les fromages non affinés y compris les fromages frais) et la norme internationale FAO/OMS A-6 (1978, modifiée en 1990), le fromage frais ou non affiné est un fromage qui est prêt à la consommation peu de temps après fabrication. Aux termes de la réglementation française (décret du 30 décembre 1988, ayant abrogé et remplacé le décret du 26 octobre 1953), la dénomination « fromage » est réservée à un produit fermenté ou non, obtenu par coagulation du lait, de la crème ou de leur mélange, suivie d'égouttage. Tous les fromages frais ont une DLC de 24 jours.

Les fromages frais sont traditionnellement des fromages à égouttage lent, fabriqués à partir de laits ou de crèmes propres à la consommation humaine (Boutonnier and Dunant, 1990). Ils résultent de la coagulation à prédominance lactique du lait, combinant souvent l'action des ferments lactiques et celle de la présure. Ces fromages se caractérisent par l'absence d'affinage après les étapes d'égouttage et de moulage (Corrieu and Luquet, 2005).

### 2.3.1. Composition du fromage frais

Le tableau 1, illustre la composition moyenne d'un fromage frais pour 100g (Eck and Gillis, 2006).

**Tableau 1.** Principales constituants d'un fromage frais

<b>Constituants en (g)</b>	<b>Fromage frais</b>
Eau	80
Glucides	04
Lipides	07,5
Protéines	08,5
Calcium	100
Sodium	40
Vitamines en (unité internationale)	170

### 2.3.2. Transformation du lait en fromage

La transformation du lait en fromage comporte trois étapes principales : la coagulation, l'égouttage et l'affinage. L'étape d'affinage n'existe pas dans le cas des fromages frais (Evette, 1975). Un bon rendement fromager dépend de la qualité du lait réceptionné tels que sa composition chimique, sa richesse en caséines, sa charge microbienne, la nature de sa microflore et son aptitude au développement des bactéries lactiques. Elle dépend aussi de son comportement vis-à-vis de la présure (Remeuf et *al.*, 1991).

- **Coagulation du lait**

La fabrication du fromage nécessite une phase de coagulation du lait, qui permet l'expulsion plus ou moins grande d'une partie de l'eau et de la matière soluble (le sérum). On obtiendra ainsi un caillé ou un fromage non affiné (Lenoir et *al.*, 1983).

La coagulation correspond à une modification physico-chimique des micelles de caséine sous l'action d'enzymes protéolytiques et/ou d'acide lactique. Celle-ci entraîne la formation d'un réseau protéique tridimensionnel appelé coagulum ou gel. Les mécanismes proposés dans la formation du coagulum diffèrent totalement selon que ces modifications sont induites par

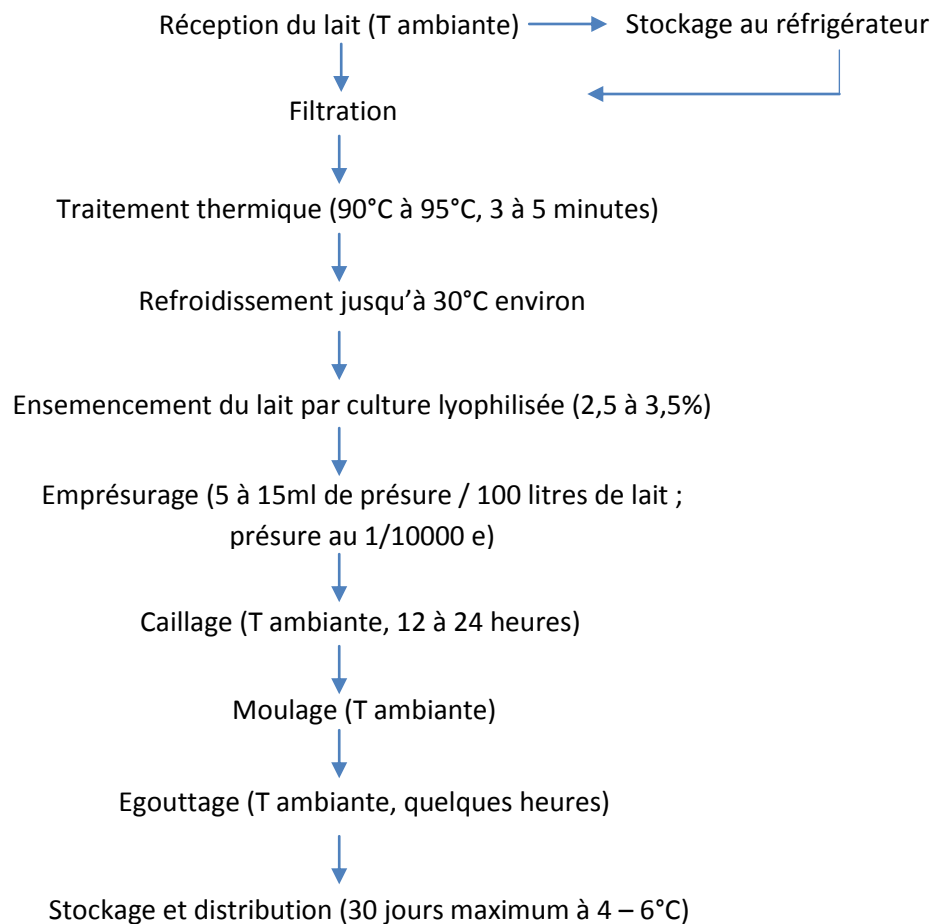
acidification ou par actions d'enzymes coagulantes ou encore par l'action combinée des deux (Eck and Gillis, 1990).

- **Egouttage**

L'égouttage est un phénomène dynamique qui se caractérise par la quantité de lactosérum éliminé durant le temps. En effet, il fixe les caractéristiques physiques (pH et aw) et chimiques du caillé et par conséquent l'affinage du fromage (Weber, 1997).

Le processus d'égouttage est lié à des facteurs directs correspondant à des traitements de types mécaniques et thermiques, des facteurs indirects (acidification et coagulation enzymatique) et des facteurs liés à la matière première (richesse en caséine laitière, en protéines solubles et en matières grasses) (Ramet, 1997).

Selon le type d'égouttage effectué, deux catégories de fromages se distinguent : le fromage égoutté en moule et le fromage égoutté en vrac sous forme de pâte où l'égouttage passe avant le moulage (Eck and Gillis, 2006).



**Figure 5.**Diagramme de fabrication de fromage frais

### 3. Matériel et Méthodes

#### 3.1. Lieu et objectif du travail

L'ensemble de ce travail a été réalisé au sein du laboratoire de Recherche en Sciences et Techniques de Production Animale (LSTPA) au niveau de l'exploitation agricole de Hassi Mamèche, affiliée à l'Université de Mostaganem.

Ce travail a pour but d'étudier quelques aptitudes technologiques (pouvoir acidifiant, protéolytique, lipolytique et aromatique) de 05 ferments constitués d'un mélange de Lactocoques et de *Leuconostoc* pour fabriquer des fromages frais.

#### 3.2. Origine des souches utilisées

Les souches étudiées ont été toutes isolées à partir du Jben de chèvre de la région de Naâma, identifiées par quelques tests phénotypiques et confirmées par l'analyse spectrométrique de masse (MALDI TOF / MS).

L'identification et l'origine des 6 souches de bactéries lactiques appartenant aux genres *Lactococcus* et *Leuconostoc* sont présentées dans le tableau 2.

**Tableau 2.** Identification et origine des souches de bactéries lactiques isolées du Jben de chèvre.

N°	Code de la souche	Identification	Score d'identification MALDI TOF	Origine
BL1	G'3	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	2,014	Jben de chèvre -Ain Sefra-
BL3	ND2	<i>Ln. mesenteroides</i>	2,099	Jben de chèvre -El Biodh-
BL4	ND6	<i>Lactococcus lactis</i>	2,089	Jben de chèvre -El Biodh-
BL6	ND8	<i>Ln. Mesenteroides sp mesenteroides</i>	2,222	Jben de chèvre -El Biodh-
BL7	ND9	<i>Lc. Lactis</i>	1,986	Jben de chèvre -El Biodh-
BL10	NF3	<i>Lc. Lactis</i>	2,207	Jben de chèvre -Naâma-

#### 3.3. Milieux de cultures

Pour cette étude, on a utilisé plusieurs milieux de cultures :

- Le bouillon M17 pour revivifier, conserver et préparer les cultures overnight;
- Le milieu M17 gélosé, pour la purification des différentes souches de bactéries lactiques isolées ;
- le milieu PCA, pour l'étude de l'activité protéolytique des souches de bactéries lactiques, ainsi que les ferments ;
- Le bouillon Clark & Lubs pour l'étude de la production d'acétoïne ;
- Le milieu triglycéride pour apprécier le pouvoir lipolytique des souches étudiées ;

- Le lait, utilisé aussi comme un milieu d'enrichissement et de conservation, peut être aussi utilisé pour d'autres tests comme celui de la production d'acétoïne ou pour l'étude de l'acidification.

### **3.4. Revivification des souches lactiques**

La revivification des souches de bactéries lactiques choisies pour la constitution de nos ferments a été faite sur bouillon M17.

Après une incubation à 30°C pendant 24 heures, le résultat sera observé par l'apparition d'un trouble.

### **3.5. Purification des souches**

Après avoir cultivé les souches sur bouillon M17, vient l'étape de purification. Elle consiste à réaliser sur gélose M17 un ensemencement des souches par la méthode des stries et incubé à 30°C pendant 24 heures à 48 heures.

L'opération est répétée plusieurs fois jusqu'à l'obtention de cultures pures.

La pureté des souches est contrôlée par observation macroscopique (aspect des colonies, taille...) et microscopique (après coloration de Gram) pour confirmer l'identité des bactéries isolées.

La coloration de Gram, nécessaire pour l'observation microscopique, détermine la morphologie et la forme des bactéries isolées. Elle permet aussi de différencier les bactéries Gram positives de celles à Gram négatives.

Le test de catalase, primordial dans ce type d'identification, permet aussi de distinguer les bactéries catalase positives par rapport à celles qui n'ont pas de catalase.

Le test consiste à verser une goutte de peroxyde d'hydrogène sur une lame de verre et d'y ajouter à l'aide d'une pipette Pasteur stérile, une colonie isolée d'une culture de moins de 24 heures. S'il y a effervescence, l'activité de l'enzyme catalase est positive, s'il ne se produit rien (pas d'effervescence), le test est considéré comme négatif (Larpen *et al.*, 1990).

### **3.6. Conservation des souches**

La conservation des souches peut être de courte durée ou de longue durée.

Dans le premier cas ; il s'agit de cultures overnight de chaque souche pure dans du bouillon M17, conservé à 4°C et cela pendant 4 semaines.

Dans le deuxième cas de conservation, le principe consiste à effectuer un ensemencement massif des cultures jeunes sur bouillon M17 ou lait écrémé, additionné de glycérol qui joue un rôle de cryoprotecteur (Champagne *et al.*, 2000). La conservation est faite à -20°C.

### 3.7. Choix des ferments

Pour le choix des ferments (de F<sub>1</sub> à F<sub>5</sub>) on a pris en considération les souches productrices d'acétoïne ainsi que l'obligation d'avoir deux souches de genres et d'espèces différentes (une appartenant au genre *Lactococcus* et une autre au genre *Leuconostoc* avec respectivement un ratio de (1 : 2v/v).

- Les aptitudes des souches en culture pure, ont fait l'objet d'une étude menée par une autre étudiante.

### 3.8. Etude de quelques aptitudes technologiques des ferments reconstitués

Les ferments constitués comme mentionnés dans le tableau 3, ont été soumis à une évaluation de leurs aptitudes technologiques fromagères (pouvoir acidifiant, protéolytique, lipolytique et la production d'acétoïne).

**Tableau 3.** Ferments lactiques reconstitués.

Ferments	Code de la souche
F <sub>1</sub>	G'3 + NF3
F <sub>2</sub>	G'3 + ND9
F <sub>3</sub>	G'3 + ND6
F <sub>4</sub>	ND2 + NF3
F <sub>5</sub>	ND8 + NF3

#### 3.8.1. Pouvoir acidifiant

La mesure de l'activité acidifiante consiste à suivre d'une part l'évolution du pH des différents ferments en fonction du temps et d'autre part à doser simultanément l'acidité titrable en degré Dornic par la soude (NaOH) N/9.

- Du lait écrémé reconstitué à 10% de matière sèche a été préparé dans des flacons ;
- Après stérilisation et refroidissement à la température d'ensemencement, chaque flacon estensemencé à 1% par une culture (1 ferment) puis incubé à 30°C fois, les ferments ont étéensemencés en deux étapes, d'abord la souche *Lactococcuslactis* à 0 heure puis un ajout de la souche *Leuconostoc mesenteroides* 05 heures du debut d'incubation.
- A partir de 0h et à intervalle de temps de 2 heures, 10ml de lait sont prélevé pour mesurer le pH puis titrés par la soude dornic N/9, en présence de 4 gouttes de phénolphtaléine (soit 200µl) jusqu'au virage de la couleur rose au rose pâle persistant au moins 10 secondes.

L'acidité est déterminée par la formule :

$$\text{Acidité (D}^\circ\text{)} = \text{NaOH} \times 10$$

Où V<sub>NaOH</sub> : Volume de NaOH utilisé pour titrer l'acide lactique.

La mesure du pH est faite directement par le pH mètre en plongeant l'électrode dans le volume du lait juste avant le dosage de l'acidité dornic.

### **3.8.2. Pouvoir protéolytique**

Pour déterminer l'activité protéolytique des ferments, la gélose PCA additionnée de lait écrémé 0% à différentes concentrations (1%, 2%, 4%, 5% ,8% et 10% ) a été préparée.

Des disques de papiers Wattman stériles ont été déposés en surface de la gélose. Chaque disque reçoit un volume de 5µl d'une culture jeune (2v/v), c'est-à-dire (2v*Lactococcus* / 1v*Leuconostoc*).

Après une incubation à 30°C pendant 24 heures à 48 heures, la protéolyse est révélée par des zones claires autour des disques (Veuillemard, 1986). Le diamètre de la zone de lyse (zone claire) est mesuré en mm.

### **3.8.3. Pouvoir lipolytique**

La lipolyse est mise en évidence sur gélose aux triglycérides. La méthode utilisée pour ce test est la même citée dans le paragraphe 3.8.2.

Après une incubation à 30°C pendant 24 à 48 heures, la lipolyse est révélée par une zone d'éclaircissement entourée d'un dépôt autour des disques (Guiraud, 2003). Le diamètre de cette zone est mesuré en mm.

### **3.8.4. Production d'acétoine**

La recherche de l'acétoine est testée par la réaction de VogesProskauer (VP) (Facklam and Elliot, 1995).

Ce test consiste à ensemencé les ferments à 2% dans 4ml du bouillon Clark et Lubs et à 1% dans 10ml de lait écrémé.

Après incubation et vérification de l'apparition de trouble dans le bouillon et la coagulation du lait, 4 gouttes des 2 réactifs VP<sub>1</sub> et VP<sub>2</sub>(soit 200µl de chaque réactif) seront ajoutés suivi d'une légère agitation pour le bouillon.

Après 10 minutes, un résultat positif se traduira par une coloration rose en surfacepouvant diffuser dans tout le milieu.

### **3.9. Fabrication du fromage frais :**

#### **3.9.1. Etude des ferments**

Les ferments sélectionnés ont servi à préparer des fromages frais qui ont par la suite été soumis à l'appréciation d'un jury pour réaliser une évaluation sensorielle pour chacun d'eux.

Afin de préparer des fromages frais au laboratoire, les ferments sélectionnés ont été préparé de la manière suivante :

##### **a. Préparation du levain**

- Des cultures overnights (moins de 18 heures d'incubation), de chaque souche sélectionnée pour la constitution des ferments, ont été réalisées dans du bouillon M17 et incubées à 30°C.
- La concentration utilisée pour les souches dans la préparation des levains était de  $10^8$  UFC/ml.
- Pour chaque souche, un inoculum a étéensemencé à raison de 1% dans 100ml de lait écrémé stérile (reconstitué à 12%), l'incubation a été à 28°C pendant 24 heures.

##### **b. Préparation du lait**

- En utilisant une poudre de lait enrichie en protéines, on a reconstitué le lait qu'on a utilisé plus tard pour préparer les fromages, en ajoutant de l'eau distillée.
- L'eau est laissée « mûrir » avant utilisation afin de permettre une meilleure dissolution des graines de poudre et une meilleure homogénéisation avec l'eau ajoutée.
- Le lait est chauffé à 85°C pendant 20 secondes (tout en le mélangeant) avant de le refroidir immédiatement (au bain marie) à 35°C.

##### **c. Préparation du fromage**

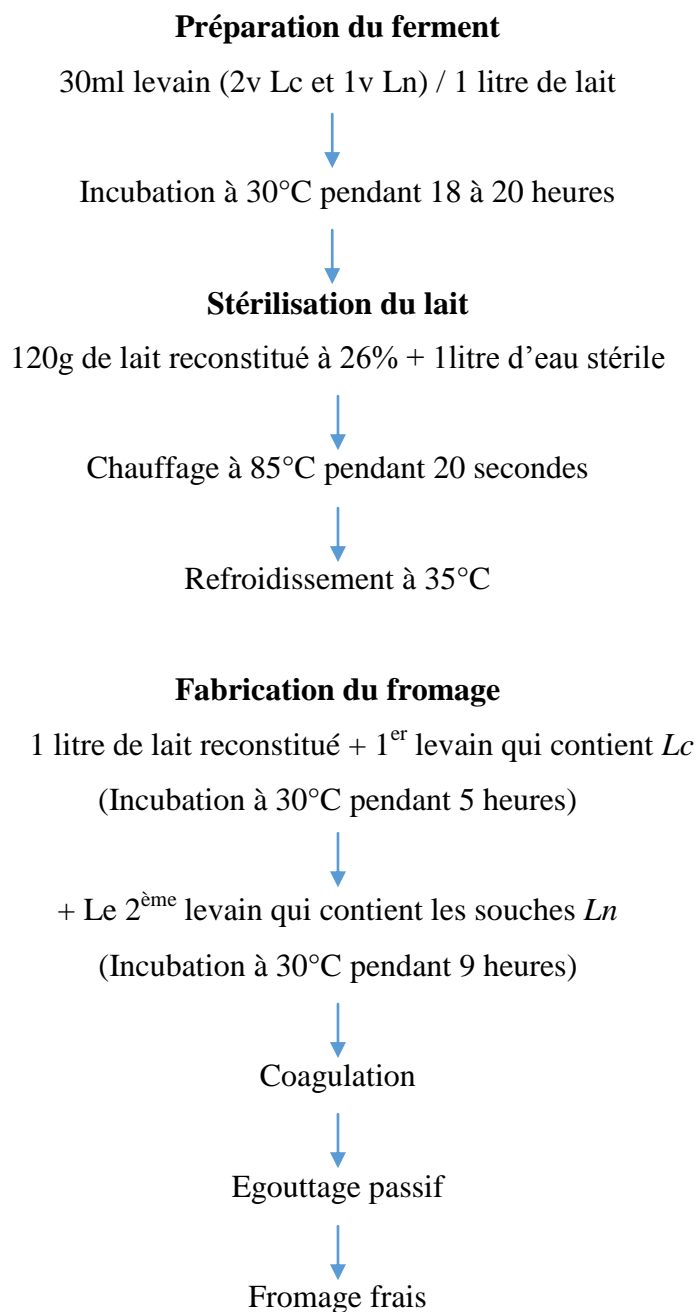
Le procédé de fabrication du fromage frais est illustré dans la figure 6.

Le levain a été incorporé dans le lait à raison de 5% (80% de souches du genre *Lactococcus* et 20% du genre *Leuconostoc*) en deux étapes :

- D'abord, les souches du genre *Lactococcus* ont été ajoutées au lait, puis incubées à 25°C pendant 5 heures ;
- Après 5 heures d'incubation, on a rajouté le reste du levain (les souches du genre *Leuconostoc*), et remettre le lait à incubation à 30°C pendant 9 heures (soit en tout 14 heures d'incubation) ;
- Après formation d'un coagulum, le caillé lactique a été chauffé à plus de 40°C pour faire remonter le lactosérum ;



- L'étape d'égouttage a été réalisée spontanément à l'aide d'une passoire. Cette opération n'aura duré que quelques minutes, le but était de garder une haute teneur en humidité dans le fromage frais ;
- Les fromages ont été mis dans des moules spéciaux afin de le conserver à 4°C.



**Figure 6.** Etapes de fabrication de fromage frais

### **3.11. Dégustation et analyse sensorielle :**

Par définition, l'analyse sensorielle consiste à analyser les propriétés organoleptiques des produits par les organes de sens. Les caractéristiques organoleptiques des fromages comportent : l'apparence, la texture, et l'ensemble des sensations olfacto-gustatives (soit les odeurs, les arômes, les saveurs et les sensations trigéminales). L'aspect d'un fromage, sa couleur, son odeur, sa consistance, sa saveur, son arôme stimulant les sens ; de la vue, de l'ouïe, du toucher, de l'odorat et du goût et provoquant des réactions plus ou moins vives d'acceptation ou de rejet. Ce sont ces différentes propriétés des fromages qui ont été discutées pour une meilleure approche de la classification.

Les séances de dégustation de nos fromages frais préparés se sont déroulées en 2 fois, dans des conditions normalisées et un test hédonique par des professeurs spécialistes et des personnes non entraînées.

Les fromages ont été dégustés par groupe de 4 afin de ne pas créer une contrainte trop forte sur le jury (dégustateurs).

Les fiches de dégustation sont produites en annexe.

# *Partie Expérimentale*

## 4. Résultats et discussion

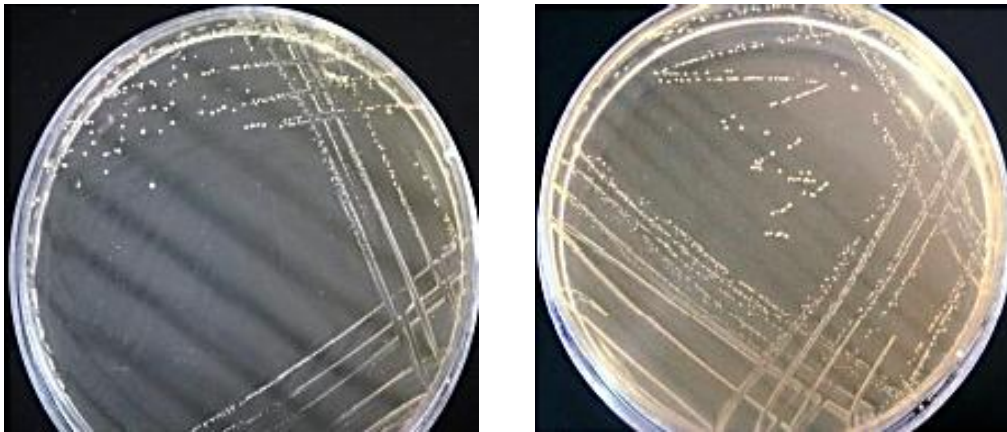
### 4.1. Identification des bactéries lactiques

#### 4.1.1. Observation macroscopique

Les isolats qui ont été revivifiés et purifiés sur milieu M17, sont apparus de petite taille, de forme circulaire, à pourtour régulier et de couleur blanchâtre.

Dans le bouillon M17, les souches présentent un trouble homogène qui caractérise le groupe des bactéries lactiques.

Les figures 7 et 8, montrent respectivement l'aspect macroscopique des bactéries lactiques isolées sur gélose et le trouble apparent sur bouillon M17 après 24 heures d'incubation à 30°C.



**Figure 7.** Observation macroscopique des deux genres de bactéries lactiques sur milieu M17 gélosé après 24 heures d'incubation (à droite : *Leuconostoc*, à gauche : *Latococcus*).

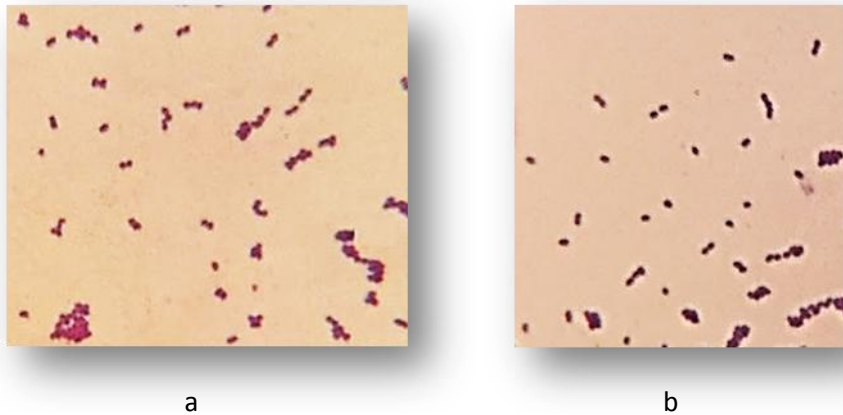


**Figure 8.** Trouble apparent des cultures lactiques dans le bouillon M17 après 24 heures d'incubation à 30°C.

#### 4.1.2. Observation microscopique

L'observation microscopique des souches lactiques isolées à révéler une seule forme de cellules ; des cocci disposés en paires ou en courtes chaînettes.

La figure 9, dévoile l'aspect microscopique et le mode d'arrangement des isolats lactiques, après coloration de Gram.



**Figure 9.** Observation microscopique des deux genres de bactéries lactiques après coloration de Gram (a : *Leuconostoc*, b : *Latococcus*).

L'analyse microscopique a montré aussi que tous les isolats étaient Gram positif et catalase négative, deux propriétés qui comptent parmi les caractéristiques des bactéries lactiques.

## 4.2. Résultats d'études de quelques aptitudes technologiques des ferments reconstitués

### 4.2.1. Pouvoir acidifiant

Les résultats du test d'acidification par les différents ferments lactiques constitués sont présentés dans le tableau 4 et 5 et représentés schématiquement dans les figures 10 et 11.

D'après les résultats obtenus, nous remarquons que la totalité de nos ferments présentent une acidification appréciable : par une augmentation de l'acidité Dornic provoquée par la production progressive d'acide lactique due à la fermentation du lactose présent dans le lait, ainsi qu'un abaissement du pH du milieu .

Il paraît que le ferment F<sub>2</sub> composé des deux souches (G'3 + ND9) soit le plus acidifiant par rapport aux autres ferments , avec un pH qui atteint 5,06 et une acidité Dornic de 58.07 °D après 24 d'incubation à 30° C.

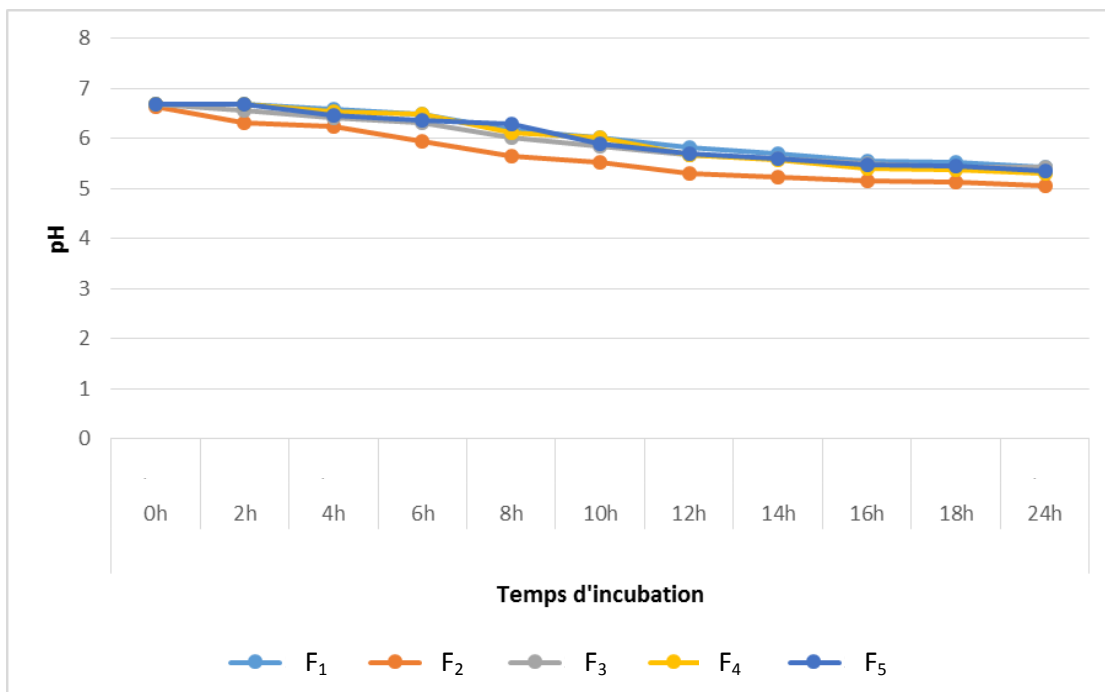
Les ferments F<sub>4</sub> et F<sub>5</sub> ont un pH moins bas au bout de 24 heures mais produisent presque la même quantité d'acide lactique que le ferment F<sub>2</sub> (pH 5.31 et 58 D pour F<sub>4</sub> ET pH 5.36 et 58.33 °D pour F<sub>5</sub>).

Les ferments F<sub>1</sub> et F<sub>3</sub> sont les moins performants pour cette activité car ils atteignent respectivement un pH de 5.43 et 5.42 ainsi qu'une acidité Dornic de 54.67 et 49.67 °D après 24 heures.

En comparant ces résultats avec l'activité acidifiante de souches lactiques utilisées en industries agroalimentaire (118 °D et pH 4.66 pour *lactococcus lactis* et 115 °D et pH 4.61 pour *leuconostoc mesenteroides* (Dahou,2017), il est évident que la vitesse d'acidification de nos ferments est lente .Cependant , elle nous permet à la fin d'obtenir un bon coagulum pour fabriquer un fromage de qualité.

**Tableau 4.** Evolution du pH des ferments lactiques en fonction du temps d'incubation.

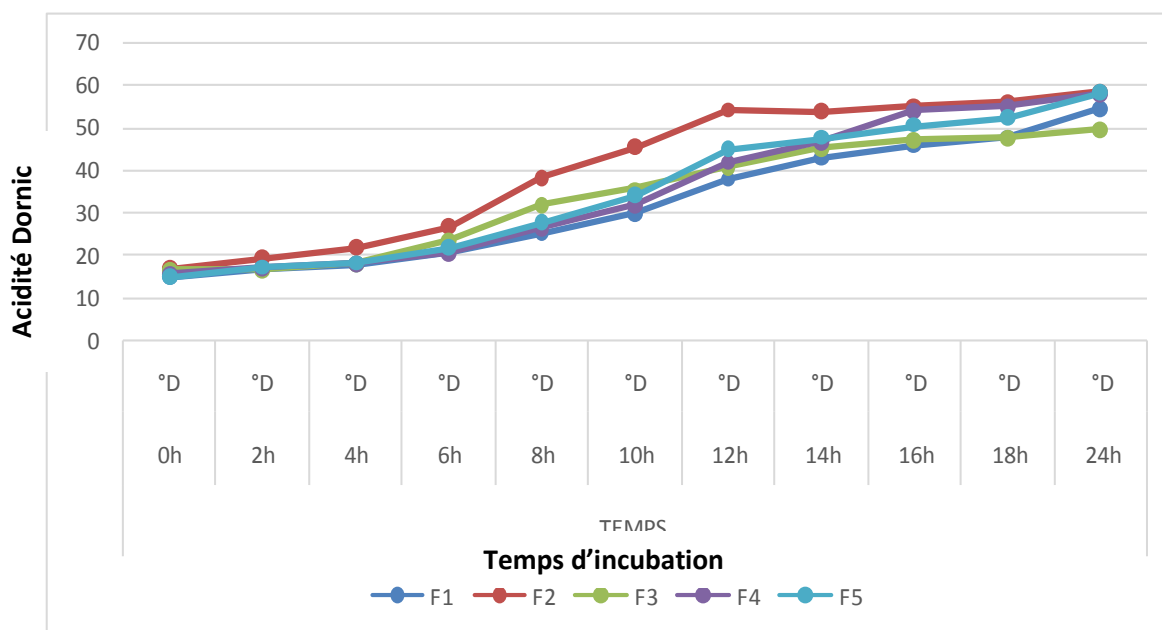
Temps d'incubation	Evolution du pH	F1	F2	F3	F4	F5
0h		6,7	6,64	6,68	6,7	6,7
2h		6,69	6,32	6,56	6,68	6,68
4h		6,58	6,25	6,42	6,53	6,46
6h		6,5	5,95	6,32	6,48	6,37
8h		6,16	5,64	6,02	6,11	6,30
10h		6,02	5,52	5,84	6,01	5,90
12h		5,83	5,31	5,68	5,68	5,69
14h		5,69	5,22	5,6	5,57	5,6
16h		5,55	5,16	5,51	5,41	5,48
18h		5,52	5,13	5,43	5,38	5,44
24h		5,43	5,06	5,42	5,31	5,36



**Figure 10.** Représentation schématique de l'évolution du pH des ferments lactiques testés en fonction du temps d'incubation.

**Tableau 5.** Evolution de l'acidité Dornic des ferments lactiques en fonction du temps d'incubation.

Temps d'incubation	Evolution d'Acidité Dornic en °D ↓	F1	F2	F3	F4	F5
0h		15	17	16,67	15,67	15
2h		17	19,66	16,66	17,33	17,33
4h		18	22	18,33	18,33	18,33
6h		21	27	23,66	20,66	22
8h		25,5	38,33	32	26,33	27,66
10h		30	45,66	35,66	32	34,33
12h		38	54,33	40,66	42	45
14h		43	54	45,33	46,67	47,67
16h		46	55,33	47	54	50,66
18h		48	56	47,66	55	52,33
24h		54,67	58,67	49,67	58	58,33

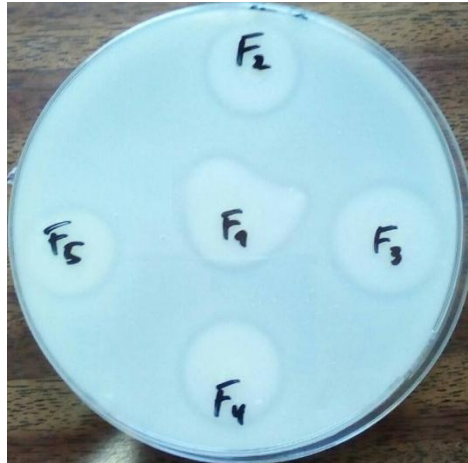


**Figure 11.** Représentation schématique de l'évolution de l'acidité Dornic des ferments lactiques testés en fonction du temps d'incubation.

#### 4.2.2. Pouvoir protéolytique

Il en ressort des résultats obtenus, que tous les ferments reconstitués présentent une croissance avec une activité protéolytique traduite par l'apparition d'un halo clair autour des disques.

La figure 12, montre clairement les zones d'hydrolyse de la protéine caséine du lait par les différents ferments constitués.



**Figure 12.** Activité protéolytique des différents ferments lactiques ensemencés après 24 heures d'incubation à 30°C.

Les résultats de mesure du diamètre d'hydrolyse des différents ferments après 24 heures et 48 heures d'incubation sont résumés dans les tableaux 6 et 7 et représentés schématiquement dans les figures 13 et 14.

En fromagerie l'activité protéolytique optimale se situe entre 5 et 15 mm de diamètres pour la zone de lyse à 10 % de lait écrémé, des valeurs au dessus de cet intervalle auraient un effet indésirable sur le produit fini et en dessous de 5 mm l'activité serait insuffisante pour avoir un bon fromage (Dahou, 2017).

On remarque que les ferments F<sub>1</sub> et F<sub>2</sub> présentent des diamètres de zone de lyse dans les normes à 10 % de lait écrémé, et que F<sub>3</sub>, F<sub>4</sub> et F<sub>5</sub> se trouvent à la limite maximale de la norme.

Le ferment F<sub>2</sub> présente un pouvoir protéolytique conséquent par rapport aux autres ferments avec des diamètres de 19.90 mm et 19.35 mm respectivement et à 1% et 2% de lait ajouté. Cependant à 4% ,les deux ferments F<sub>1</sub> et F<sub>3</sub> prennent de l'ampleur avec des valeurs de diamètres de lyse distinctives égales à 23.46 mm et 22.15 mm.

Pour les deux autres ferments F<sub>4</sub> et F<sub>5</sub>, l'activité protéolytique a pris son élan à des pourcentages élevés de poudre de lait rajouté, à savoir (5% et 10%).

Après 48 heures d'incubation, l'activité protéolytique du ferment F<sub>1</sub>, a atteint son apogée avec un diamètre d'hydrolyse de 38.40 mm suivi par le ferment F<sub>3</sub> présentant lui aussi un diamètre

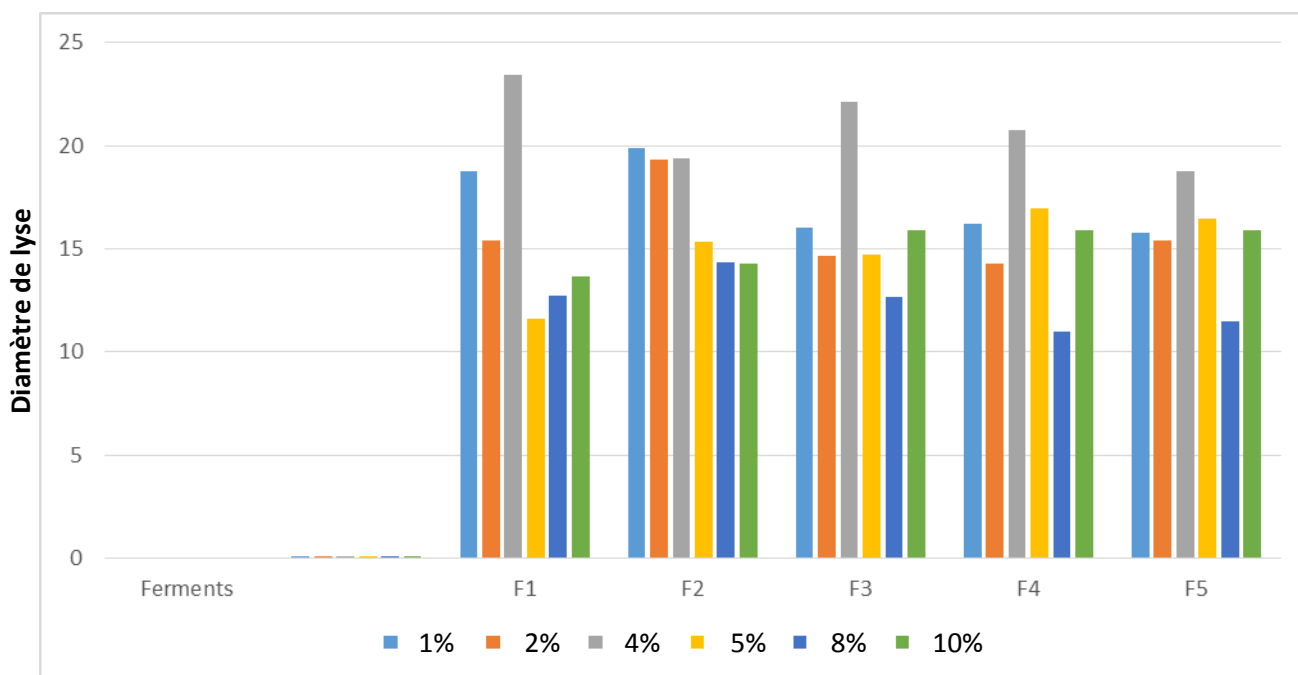


de lyse assez élevé égale à 34.17 mm de diamètre et ce à un même pourcentage de poudre de lait rajouté (4%).

Les autres ferments ont atteint aussi des valeurs élevées pour le même pourcentage de poudre de lait rajouté, signe d'une activité élevée pour tous les ferments à ce même pourcentage.

**Tableau 6.** Résultats de l'activité protéolytique des ferments lactiques reconstitués après 24 heures d'incubation.

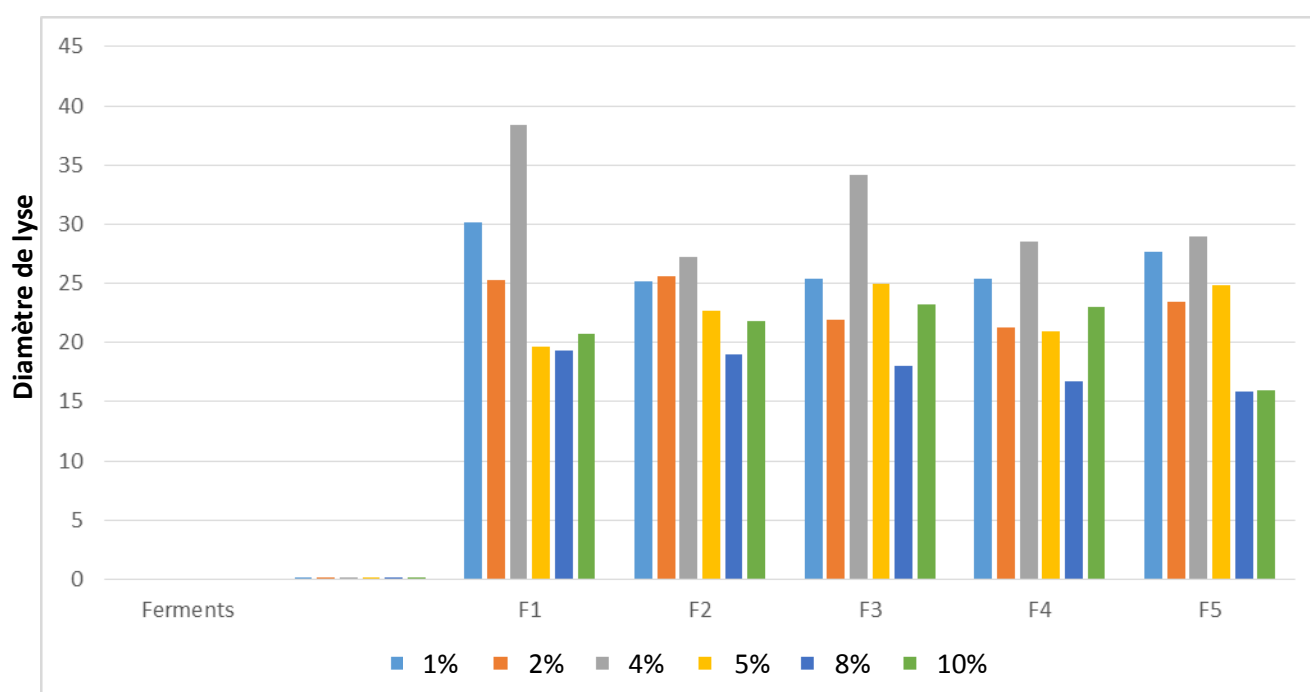
Ferments	% de poudre de lait rajouté					
	1%	2%	4%	5%	8%	10%
F1	18.74	15.42	23.46	11.60	12.75	13.64
F2	19.90	19.35	19.42	15.37	14.33	14.30
F3	16	14.65	22.15	14.73	12.69	15.89
F4	16.19	14.26	20.79	16.99	10.96	15.90
F5	15.75	15.43	18.78	16.48	11.51	15.91



**Figure 13.** Diamètres des zones d'hydrolyse des protéines par les ferments lactiques reconstitués à différents pourcentages de poudre de lait rajouté après 24 heures d'incubation.

**Tableau 7.** Résultats de l'activité protéolytique des ferments lactiques reconstitués après 48 heures d'incubation.

Ferments	% de poudre de lait rajouté					
	1%	2%	4%	5%	8%	10%
F1	30.13	25.31	38.40	19.61	19.37	20.69
F2	25.13	25.62	27.22	22.65	18.97	21.78
F3	25.37	21.95	34.17	25.00	18.06	23.20
F4	25.38	21.32	28.55	20.98	16.74	23.02
F5	27.67	23.49	28.99	24.81	15.89	15.95



**Figure 14.** Diamètres des zones d'hydrolyse des protéines par les ferments lactiques reconstitués à différents pourcentages de poudre de lait rajouté après 48 heures d'incubation.

Ces résultats nous permettent de confirmer d'une part le caractère protéolytique des ferments lactiques dû à la présence d'une protéase de paroi, comme il a été rapporté par (Desmazeaud, 1990, Sanni, et al., 2002) et d'autre part, l'intérêt important de ces ferments lactiques par cette même activité en industrie laitière. Cependant, il est à signaler ici que presque tous les diamètres d'hydrolyse après 48 heures d'incubation dépassent les 20mm, qui est le diamètre limite au-delà duquel il y aura amertume. Donc les résultats de protéolyse après 24 heures sont meilleurs surtout pour le ferment F<sub>5</sub>.

### 4.2.3. Pouvoir lipolytique

Les résultats de ce test, montrent que pour l'ensemble des ferments il y'a absence totale de zones de lyse autour des disques comme montré dans la figure 15, ce qui implique que les 5 ferments ne possèdent pas d'activité lipolytique.

Ces résultats sont en accords avec ceux obtenus par Crow et *al* (1994), qui ont montré que les bactéries lactiques sont faiblement lipolytique et que cette activité pouvait être définitivement perdu pour certaines souches mutantes de *lactococcus lactis* (Corrieu et Luquet.,2008).



**Figure 15.** Résultats du test de lipolyse des 5 ferments lactiques reconstitués après 24 heures d'incubation à 30°C.

### 4.2.4. Production d'acétoïne

Les résultats de tous les ferments se sont illustrés par une légère coloration qui vire vers le marron (Figure 16), ce résultat est négatif quant à la production d'acétoïne pour tous les ferments testés malgré la présence d'une souche productrice dans le ferment. On peut interpréter ce résultat soit par une très faible production d'acétoïne restée indétectable, soit par la transformation de l'acétoïne en un autre métabolite comme le 2,3 Butanediol ou le diacétyl. Soit par la perte totale de cette activité par les ferments.



**Figure 16.** Résultats du test de production d'acétoïne.

### 4.3. Résultats de fabrication du fromage

Après avoir préparé nos ferments lactiques,ensemencés par la suite dans du lait reconstitué et incubé pendant 14 heures à 30°C, le caillé obtenu après égouttage était soit ferme, friable, ou sableux. Une première constatation qui peut être soutenue ou réfutée par nos dégustateurs.

La figure 17 montre l'aspect de quatre sortes de fromages frais obtenus après caillage et égouttage.



**Figure 17.** Quatre aspects de 4 fromages frais obtenus après caillage et égouttage.

#### 4.4. Résultats de la dégustation et de l'analyse sensorielle

D'après les résultats obtenus, il paraît que quelques fromages fabriqués à partir de nos 5 ferments, présentent des qualités quasi similaires au fromage frais préparé à base de ferments industriels (petit suisse). Cela indique que nos souches sélectionnées possèdent de bonnes aptitudes technologiques qui peuvent être exploitées.

Les résultats de dégustation montrent que tous nos fromages nature possèdent un goût lactique et doux. Le plus appréciable est celui fabriqué à partir du ferment F<sub>5</sub> et le moins estimé est celui fabriqué avec le ferment F<sub>3</sub> ; ce dernier était friable avec un goût fade.

Pour la deuxième dégustation, nos fromages retravaillés cette fois-ci par l'ajout de sel, d'ail et de persil ont conquis nos dégustateurs, mais le fromage le plus estimé reste toujours celui qui a été fabriqué par le ferment F<sub>5</sub>.

Une remarque à prendre aussi en considération montre que les personnes plus mûres (plus de 38 ans) ont une préférence pour les fromages frais de goût nature, comparativement aux jeunes étudiants qui ont une nette préférence pour les fromages retravaillés / aromatisés.

Aussi, par rapport au goût désagréable de certains fromages non appréciés par certains dégustateurs, est sûrement lié à une forte protéolyse des ferments lactiques utilisés dans la fabrication.

Tous les résultats de dégustation et de l'analyse sensorielle (examen visuel, olfactif, gustatif, finale en bouche, et impression générale) des fromages frais fabriqués à base de nos ferments lactiques reconstitués sont présentés en annexe.

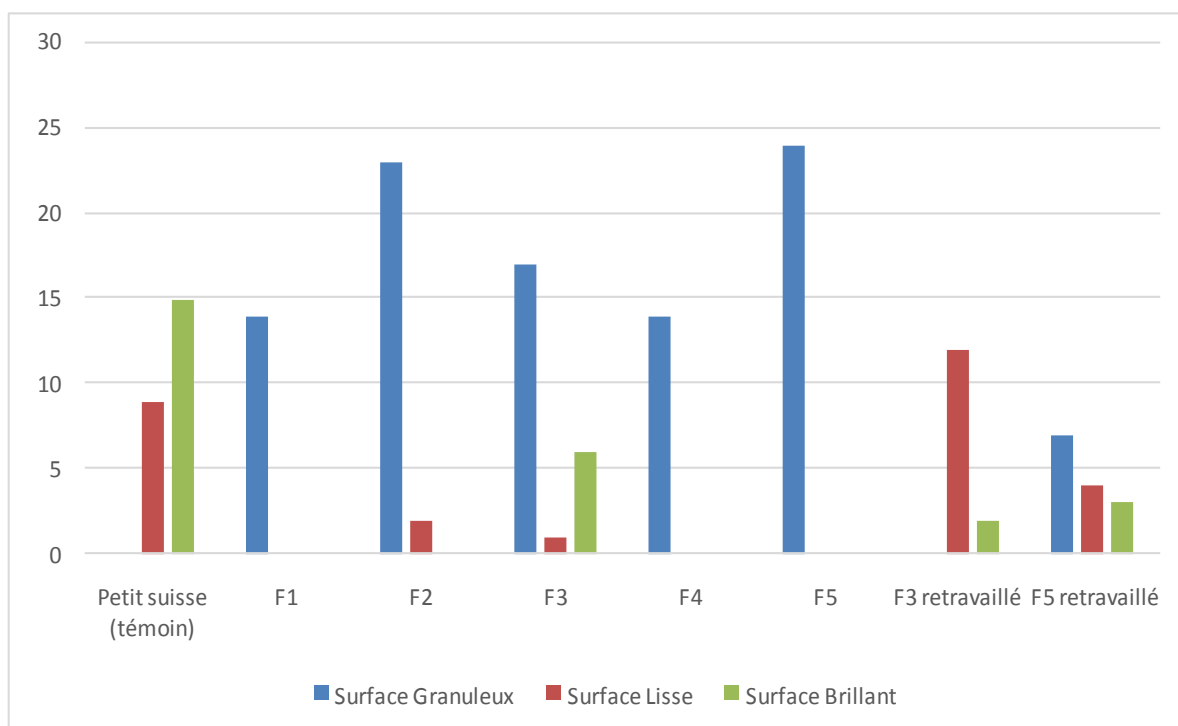
- **L'examen visuel** (surface, couleur, aspect)

Le tableau 8 et la figure 18 donnent les résultats de nos dégustateurs via un seul aspect visuel (surface) de nos fromages frais, après dégustation.

Le tableau 9 et la figure 19, illustrent l'impression générale des dégustateurs via les différents fromages frais préparés à base de ferments lactiques reconstitués

**Tableau 8.** Appréciation des dégustateurs après examen visuel (surface) du fromage frais.

	Surface		
	Granuleux	Lisse	Brillant
<b>Petit suisse (témoin)</b>	0	9	15
<b>F<sub>1</sub></b>	14	0	0
<b>F<sub>2</sub></b>	23	2	0
<b>F<sub>3</sub></b>	17	1	6
<b>F<sub>4</sub></b>	14	0	0
<b>F<sub>5</sub></b>	24	0	0
<b>F<sub>3</sub>retravaillé</b>	0	12	2
<b>F<sub>5</sub> retravaillé</b>	7	4	3

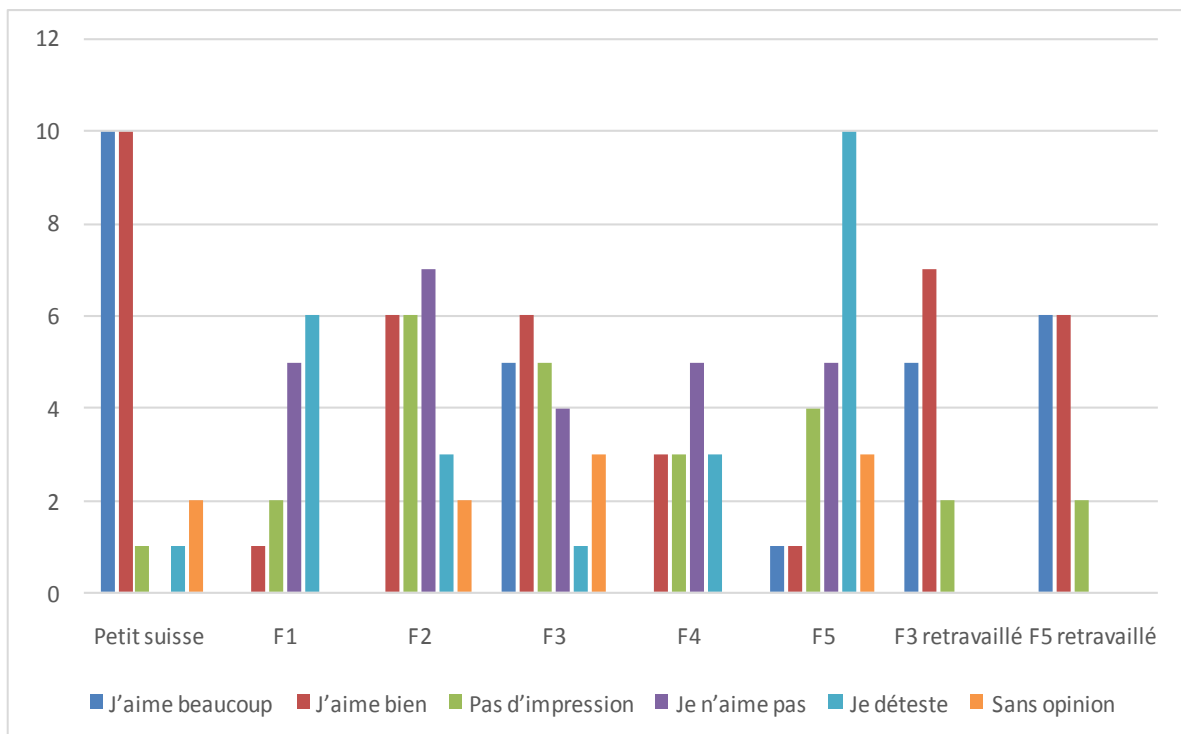


**Figure 18.** Représentation schématique de l'appréciation visuelle (surface) des fromages frais par nos dégustateurs.

- **Impression générale**

**Tableau 9.** Impression générale des dégustateurs via les différents fromages frais préparés à base de ferments lactiques reconstitués.

	<b>J'aime beaucoup</b>	<b>J'aime bien</b>	<b>Pas d'impression</b>	<b>Je n'aime pas</b>	<b>Je déteste</b>	<b>Sans opinion</b>
<b>Petit suisse</b>	10	10	1	0	1	2
<b>F<sub>1</sub></b>	0	1	2	5	6	0
<b>F<sub>2</sub></b>	0	6	6	7	3	2
<b>F<sub>3</sub></b>	5	6	5	4	1	3
<b>F<sub>4</sub></b>	0	3	3	5	3	0
<b>F<sub>5</sub></b>	1	1	4	5	10	3
<b>F<sub>3</sub> retravaillé</b>	5	7	2	0	0	0
<b>F<sub>5</sub> retravaillé</b>	6	6	2	0	0	0



**Figure 19.** Représentation schématisée de l'impression générale des dégustateurs via les différents fromages frais préparés à base de ferments lactiques reconstitués.

# *Conclusion*



# Conclusion

Dans cette étude, deux principaux objectifs sont réalisés :

Le premier objectif, consiste à constituer des ferments mésophiles, chacun composées de deux bactéries lactiques autochtones (1 *Lactococcus lactis* et 1 *Leuconostoc mesenteroides*) isolées à partir du Jben de chèvre de la région de Nâama et identifiées par MALDITOF / MS. Ces ferments lactiques constitués ont été soumis à une évaluation de leurs aptitudes technologiques.

Le second objectif, à pour intérêt l'emploi des cinq ferments lactiques mésophiles dans la fabrication des fromages frais.

Les résultats d'étude des aptitudes technologiques des différents ferments lactiques reconstitués, ont permis de révéler une aptitude protéolytique conséquente, ainsi qu'un pouvoir acidifiant satisfaisant donnant un produit fini de qualité, et laissent une possibilité d'utilisation dans la fabrication de fromage à pâte molle en les intégrant dans le ferment de ce type de produit en tant que flore d'affinage.

Tous nos fromages avaient un goût lactique doux, pas très fort, certains ont présenté un aspect friable et d'autres un aspect ferme. Le plus apprécié est le fromage frais préparé avec le ferment F<sub>5</sub> et le moins estimé a été celui fabriqué avec le ferment F<sub>3</sub>.

Après 15 jours de fabrication, les fromages préparés n'ont eu aucune modification de leurs caractéristiques, ils ont gardé leur aspect, leur couleur, leur goût, texture et odeur avec absence totale d'apparition de levures ou moisissures à leurs surfaces, choses qui révèlent que nos ferments présentent un pouvoir conservateur.

Comme perspective, ce travail mérite d'être pris en considération pour un projet futur, en complétant cette étude par des analyses des arômes par GC/MS et HPLC, des essais de fabrications pour d'autres types de fromages, des études de leurs effet conservateur, ainsi qu'une authentification des souches afin d'exploiter ces ferments Algériens au niveau industriel.

# *Annexes*

## **Annexe 1**

### **Coloration différentielle de Gram**

#### **Préparation du frottis**

En effectuant une fixation simple à l'eau et à la flamme selon les indications suivantes :

- Sur une lame, déposer une goutte d'eau stérile ;
- Ajouter avec l'anse de platine stérilisée une goutte de la colonie isolée ;
- Etaler et fixer à la chaleur à environ 40°C pendant 10 à 15 minutes ;
- Poser la lame séchée sur le portoir reposant sur un bac de coloration.

#### **Réalisation de la coloration**

- Verser le violet de gentiane sur la lame, laisser en contact 1 minute ;
- Jeter le colorant et finir de la chasser par la solution de Lugol; laisser agir le Lugol environ 1 minute ;
- Jeter le Lugol et faire couler l'alcool sur la préparation ; rincer immédiatement à l'eau ;
- Recouvrir la préparation de Safranine Fushine, laisser agir environ 1 minute. Laver abondamment ;
- Sécher au-dessus de la flamme d'un bec bensen ;
- Mettre une goutte d'huile à immersion sur la lame totalement sèche ;
- Observer au microscope à l'objectif x 100.

## Annexe 2

### Composition des milieux de culture

#### Milieu M17 (Formule en g/l d'eau distillée)

- Peptone de farine de soja	5g
- Peptone de viande	2.5g
- Peptone de caséine	2.5g
- Extrait de levure	2.5g
- Extrait de viande	5.5g
- Acide ascorbique	0.5g
- Sodium $\beta$ -glycérophosphate	19g
- Magnésium sulfate	0.25g
- Agar (si milieu solide)	12.75g
- Eau distillée QSP	1000ml
- pH = 7.1 $\pm$ 0.2	

#### Milieu Clark & Lubs

- Peptone	5g
- Glucose	5g
- Hydrogenophosphate de potassium $K_2HPO_4$	5g
- Eau distillée QSP	1000ml
- pH = 7.5 $\pm$ 0.2	

#### Milieu PCA

- Tryptone	5g
- Glucose	1g
- Extrait de levure	2,5g
- Agar	15g
- $MgSO_4$	0,250g
- Eau distillée QSP	1000ml
- pH = 7.0 $\pm$ 0.2	

#### Milieu aux triglycérides

- Peptone	5g
- Extrait de levure	3g
- Triglycérides	10ml
- Agar	15g
- Eau distillée QSP	1000ml
- pH = 6.5	

### Annexe 3

#### La mesure du pH du lactosérum et du fromage frais après égouttage

Ferment	Fromage frais	Lactosérum	
	pH	Quantité	pH
F <sub>1</sub>	5.98	800 ml	6.04
F <sub>2</sub>	5.87	670 ml	5.63
F <sub>3</sub>	6.12	660 ml	5.93
F <sub>4</sub>	5.08	790 ml	5.01
F <sub>5</sub>	5.82	750 ml	5.64

# *Références Bibliographiques*

# Références bibliographiques

- **Al Atya, A., Kh. (2016).** Recherche et caractérisation de nouveaux peptides antimicrobiens à partir de bactéries lactiques isolées de méconium, Thèse de Doctorat, Spécialité : Ingénierie des fonctions biologiques, Université de Lille 1, p.12, 14.
- **Allouache, K., Smaoun, O. (2017).** Caractérisation de Souches Locales de Bactéries Lactiques Isolées à Partir de Quelques Produits Laitiers Artisanaux et Mise au Point d'un Produit Type « Raib », Mémoire de Master, Option : Microbiologie Alimentaire et Santé, Université de Béjaia, p.5.
- **Badis, A., Laouabdia, S.N., Guetarni, D., Kihal, M., Ouzrout, R. (2005).** Caractérisation phénotypique des bactéries lactiques isolées à partir de lait cru de chèvre de deux populations caprines locales « Arabia et Kabyle », *Sciences et Technologie* 23 : 30-37.

Sepposalminen, Atte vonwright, Arthur ouwehand, (1998), lacticacidbacteria, microbiological and functional aspects, Thirdedition, revised and expanded

Boumediene Karima, (2013) : **Recherche des bactéries lactiques productrices desbactériocines et l'étude de leur effet sur des bactéries néfastes, mémoire de magister, université belkaid, tlemcen, p. 15**

**Bigret, M., 1994.** Lacticacidbacteria and organolepticproprerties of foodsin: Novel G et Le Querler J-F. Les bacteries lactiques. Actes du colloque Lactic 94 Caen 7-9 septembre 1994. pp 25-27. Presses universitaire de Caen. France.

**Novel G., «Les bactéries lactiques», In : Leveau J.Y., Bouix M., «Microbiologie industrielle : Les microorganismes d'intérêt industriel», Edition Technique & Documentation, Paris, pp.170-331, (1993).**

**Hadef S., 2012.** Evaluation des aptitudes technologiques et Propiotiques des lactiques locales. Mémoire de magister: pp 7-8.

Toumi, K, H, : Modélisation et identification paramétrique des processus de fermentation lactique, année 2009, mémoire de magister, Université Ferhat Abess, Sétif, p/ 6 – 7

Fugelsang, K, C, Edwards, C, G, 2007 : WineMicrobiology – Practical applications and procedures, lacticacidbacteria, chapter 2, Springer article, p. 36, 37

Kassas, Z (2017) : croissance des souches de bactéries lactiques d'intérêts technologiques et/ou probiotiques sur MRS végétal modifié, thèse de doctorat en Microbiologie, Université BADJI Mokhtar, Annaba, p 18.

Matthew Millette, 2007 ; étude des bactéries lactiques à potentiel probiotique et de leurs métabolites, Thèse présentée à l'INRS – Institut Armand Frappier pour l'obtention de grade de Ph.D en biologie, p18.

**Références bibliographiques :**

Weber, F, 1997 : l'égouttage du coagulum dans le fromage (Coord ACKA), 2<sup>ème</sup> édition, p. 122

Ramet, J.P, 1985 : fabrication et caractérisation d'un fromage traditionnel Algérien « Bouhezza »